

Caraterização do stresse salino em plantas de manjeriço (*Ocimum basilicum*)

Rodrigo Alexandre São Pedro Capelo

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientadores: Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato
Doutora Maria Luísa Louro Martins

Júri:

Presidente: Doutora Cristina Maria Moniz Simões Oliveira, Professora Associada com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Luísa Louro Martins; Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutor Henrique Manuel Filipe Ribeiro; Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

Serve esta secção como pequeno agradecimento a quem, de forma direta ou indireta, contribuiu para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, aos orientadores, a Professora Doutora Luísa Louro e ao Professor Doutor Miguel Mourato pelo apoio na realização da dissertação, dois dos excelentes professores e pessoas que tive o prazer de conhecer no Instituto, pela orientação e revisão dos textos, esclarecimentos de dúvidas e disponibilidade.

Um obrigado muito especial deste humilde discípulo laboratorial à Inês Leitão, pelo constante acompanhamento e ajuda do início ao fim do trabalho, tanto no trabalho prático como escrito. A ela devo uma enorme parte do que aqui foi feito e estas palavras, apesar de sinceras, não lhe fazem justiça.

Às colegas do Laboratório 17A, Filipa Pinto, Joana Sales e Inês Moreira pelo auxílio e apoio sempre disponível durante o trabalho. Ao Sr. Felício pela ajuda prestada nos trabalhos no Horto. Ao Engenheiro Miguel Martins pela leitura das amostras dos minerais extraíveis e carbono orgânico e ao Professor Doutor Ernesto Vasconcelos pela ajuda no plano de fertilização.

Um importante agradecimento ao Santander-Totta e ao Instituto Superior de Agronomia pela atribuição da bolsa de incentivo ao mestrado no início do curso, que permitiu um alívio substancial nos custos deste mestrado.

Aos meus pais, à minha irmã e avós pelo carinho e apoio (também) na realização deste trabalho e ao longo de todo o percurso académico. Ao meu tio pelas mesmas razões e além disso por me ter convencido a vir estudar para o ISA, só por si grande ajuda. É uma honra ser o primeiro da família versado em manjerição e na caracterização de plantas sob stresse salino do mesmo, mal adivinhariam.

Aos colegas e amigos que me acompanharam neste percurso, destacando o Mariano, o Mirandinha e o Marques Mendes, muito importantes na manutenção da saúde mental do autor durante o período deste trabalho.

A todos e mais, um obrigado.

Resumo

A salinidade dos solos é um problema crescente na agricultura e urge por isso quantificar e descrever os diversos efeitos deste stresse ambiental sobre as culturas. No presente trabalho estudaram-se os efeitos do stresse salino sobre o manjerição (*Ocimum basilicum* L.). Para tal, realizaram-se ensaios de germinação e crescimento em solos contaminados com NaCl, de diferentes condutividades elétricas (controlo, 2,8, 4,6, 8,3 e 13,4 dS.m⁻¹). O material vegetal (folhas, caules e raízes) foi colhido em fase intermédia do ciclo vegetativo e antes da floração e alvo da determinação de parâmetros bioquímicos e de crescimento da planta. Assim, verificou-se um efeito negativo significativo ($p < 0,05$) da salinidade sobre a capacidade germinativa, biomassa fresca, número de folhas, comprimento entrenós e altura do caule das plantas e sobre a massa seca das folhas, mas não dos caules e raízes, e no teor de clorofila das folhas. O tempo médio de germinação aumentou com a crescente condutividade elétrica do solo, mas sem diferenças significativas. Observou-se um aumento geral significativo sobre o teor de minerais analisados (Na, Cu, Ca, K, Mn, Fe, Zn, Mg) nos órgãos da planta para os tratamentos de 8,3 e 13,4 dS.m⁻¹, mas não sobre os indicadores de stresse oxidativo em estudo (H₂O₂ e malondialdeído, em amostras de folhas). Por oposição, a salinidade exerceu um efeito positivo significativo sobre o teor de prolina livre e proteína solúvel, e um efeito positivo não significativo sobre o teor de açúcares solúveis nas folhas (compostos reguladores do equilíbrio osmótico nas células). Os resultados obtidos permitem classificar o manjerição como uma cultura sensível à salinidade causada por NaCl durante a germinação e crescimento, sendo o desenvolvimento da planta afetado em maior grau pelo efeito osmótico da salinidade e impacto sobre a fotossíntese do que pelo stress oxidativo.

Palavras-chave: *Ocimum basilicum*, salinidade, NaCl, stresse oxidativo, osmólitos.

Abstract

Soil salinity is a growing problem in agriculture and, because of that, it is important to quantify and describe this environmental stress' diverse effects. In this work the effects of salt stress on sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) were studied. For such, we performed germination and growth experiments in soils contaminated with NaCl and with different electrical conductivities (control, 2.8, 4.6, 8.3 and 13.4 dS.m⁻¹). Plant material (leaves, stems and roots) was harvested in an intermediate phase of the vegetative cycle and before flowering, and was the target of determination of physical and biochemical parameters. So, a significantly negative effect of salinity ($p < 0.05$) was verified on germination capacity, fresh weight, number of leaves, internode length and plant stem height and on the dry weight of leaves, but not on stems, and root dry weight. Mean germination time increased with rising soil electrical conductivity, but without significant differences. It was observed a significant overall increase in the analyzed minerals plant's organs content (Na, Cu, Ca, K, Mn, Fe, Zn, Mg) on the 8.3 and 13.4 dS.m⁻¹ treatments, but not on the oxidative stress indicators in study (H₂O₂ and malondialdehyde). By opposition, salinity exerted a significantly positive effect on free proline content and soluble protein, and a non-significant positive effect on soluble sugars content in leaves (osmotic balance regulatory compounds). The results obtained allow us to classify sweet basil as a sensitive culture to salinity caused by NaCl in germination and growth, being the plant's development affected to a greater degree by the salinity's osmotic effect and its toll on photosynthesis rate than by oxidative stress.

Keywords: *Ocimum basilicum*, salinity, NaCl, oxidative stress, osmolytes.

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice Geral	iv
Índice de Figuras.....	vi
Índice de Quadros	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
1. Objetivos	1
2. Introdução	2
2.1 Manjeriço.....	2
2.2 Respostas fisiológicas e bioquímicas ao stresse salino	3
2.2.1 Efeitos gerais da salinidade sobre as plantas	3
2.2.2 Respostas das plantas à salinidade	7
2.2.3 Stresse oxidativo	10
2.2.4 Osmoprotetores como indicadores de stresse salino	13
3. Material e Métodos.....	15
3.1 Ensaio de germinação e crescimento em meio de salinidade elevada	15
3.2 Determinações analíticas em plantas	19
3.2.1 Determinação da capacidade germinativa e tempo médio de germinação	19
3.2.2 Determinação do teor de matéria seca dos tecidos vegetais	19
3.2.3 Determinação do teor de clorofila das folhas	19
3.2.4 Determinação do conteúdo mineral dos tecidos vegetais.....	20
3.2.5 Determinação do teor de peróxido de hidrogénio nas folhas.....	20
3.2.6 Determinação do teor de malondialdeído nas folhas	21
3.2.7 Determinação do teor de proteína solúvel nas folhas	21
3.2.8 Determinação do teor de prolina livre nas folhas.....	23
3.2.9 Determinação do teor de açúcares solúveis nas folhas	24
3.3 Determinações analíticas no solo.....	24
3.3.1 Determinação da condutividade elétrica do solo	24
3.3.2 Determinação do NPK extraíveis do solo	25
3.3.3 Determinação dos macronutrientes extraíveis do solo	25
3.3.4 Determinação dos micronutrientes extraíveis do solo	25
3.3.5 Determinação do carbono orgânico total	26
3.4 Tratamento Estatístico	26

4.	Resultados e Discussão.....	27
4.1	Efeitos do stresse salino na germinação	27
4.2	Ensaio de crescimento.....	29
4.3	Efeitos do stresse salino nos parâmetros de crescimento das plantas.....	32
4.3.1	Biomassa.....	32
4.3.2	Número de folhas	35
4.3.3	Comprimento entrenós e altura do caule	35
4.4	Efeito do stresse salino na matéria seca	38
4.5	Efeito do stresse salino no teor de clorofila das folhas.....	40
4.6	Efeito do stresse salino no conteúdo mineral dos órgãos vegetais	42
4.7	Efeitos do stresse salino nos parâmetros indicativos de stresse oxidativo	46
4.7.1	Peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂)	46
4.7.2	Malondialdeído (MDA)	47
4.8	Efeitos do stresse salino no conteúdo proteico e glucídico	49
4.8.1	Prolina livre.....	49
4.8.2	Proteína solúvel	49
4.8.3	Açúcares solúveis	50
4.9	Efeitos da salinidade nos minerais extraíveis do solo	52
4.9.1	Azoto extraível.....	52
4.9.2	Fósforo e potássio extraíveis.....	53
4.9.3	Macronutrientes extraíveis	54
4.9.4	Micronutrientes extraíveis	56
4.9.5	Carbono orgânico total.....	58
5.	Conclusões.....	60
6.	Referências Bibliográficas.....	62
	Anexos	I

Índice de Figuras

Figura 1 – Principais efeitos do excesso de sais (adaptado de Silveira <i>et al.</i> , 2010).....	4
Figura 2 – Adaptações de plantas halófitas a condições de elevada salinidade (adaptado de Greenway & Munns, 1980).....	9
Figura 3 – Relação entre a produção de ROS, sua remoção, modificação, sinalização e dano provocado em células vegetais na ausência de stresse (a) e na sua presença (b) nas condições do meio (Adaptado de Møller <i>et al.</i> , 2007).....	11
Figura 4 – Ensaio de germinação na câmara interior do Horto.....	16
Figura 5 – Crescimento das plantas de manjeriço em câmara de crescimento com condições controladas.....	17
Figura 6 – Disposição dos vasos em bancadas rotativas durante o ensaio de crescimento.....	18
Figura 7 – Capacidade germinativa em sementes de manjeriço expostas a diferentes níveis de salinidade no solo.....	27
Figura 8 – Tempo médio de germinação de sementes de manjeriço expostas a diferentes níveis de salinidade no solo.....	29
Figura 9 – Comparação visual entre plantas de diferentes modalidades de contaminação por NaCl.....	30
Figura 10 – Plantas de manjeriço após crescimento em meios com salinidade, 32 dias após transplantação.....	31
Figura 11 – Sinais de clorose nas folhas de manjeriço.....	32
Figura 12 – Biomassa de plantas de manjeriço sujeitas a diferentes níveis de salinidade: a) massa das plantas (exceto raiz); b) massa das folhas; c) massa dos caules; d) massa das raízes.....	33
Figura 13 – Rendimento relativo de várias culturas em função da condutividade do solo (adaptado de Katerji <i>et al.</i> , 2000), incluindo a curva para o manjeriço	34
Figura 14 – Número de folhas por planta de plantas de manjeriço sujeitas a diferentes níveis de salinidade.....	35
Figura 15 – Comprimento entrenós de plantas de manjeriço sujeitas a diferentes níveis de salinidade (Colheita Intermédia).....	36
Figura 16 – Comprimento entrenós de plantas de manjeriço sujeitas a diferentes níveis de salinidade (Colheita Final).....	37
Figura 17 – Altura dos caules de plantas de manjeriço sujeitas a diferentes níveis de salinidade.....	38

Figura 18 – Teor de massa seca de folhas de plantas de manjerição sujeitas a diferentes níveis de salinidade.....	39
Figura 19 – Teor de massa seca de caules de plantas de manjerição sujeitas a diferentes níveis de salinidade.....	39
Figura 20 – Teor de massa seca de raízes de plantas de manjerição sujeitas a diferentes níveis de salinidade.....	40
Figura 21 – Teor de massa seca de caules de plantas de manjerição sujeitas a diferentes níveis de salinidade.....	41
Figura 22 – Concentração de elementos minerais em folhas, caules e raízes de plantas de manjerição sujeitas a diferentes níveis de salinidade (Na, Cu, Ca e K).....	43
Figura 23 – Concentração de elementos minerais em folhas, caules e raízes de plantas de manjerição sujeitas a diferentes níveis de salinidade (Mn, Fe, Zn e Mg).....	44
Figura 24 – Relação K/Na nos tecidos de plantas de manjerição sujeitas a diferentes níveis de salinidade.....	45
Figura 25 – Concentração de H ₂ O ₂ em folhas de plantas de manjerição sujeitas a diferentes níveis de salinidade.....	47
Figura 26 – Concentração de MDA em folhas de plantas de manjerição sujeitas a diferentes níveis de salinidade.....	48
Figura 27 – Concentração de prolina livre em folhas de plantas de manjerição sujeitas a diferentes níveis de salinidade.....	49
Figura 28 – Concentração de proteína solúvel em folhas de plantas de manjerição sujeitas a diferentes níveis de salinidade.....	50
Figura 29 – Concentração de açúcares solúveis em folhas de plantas de manjerição sujeitas a diferentes níveis de salinidade.....	51
Figura 30 – Concentração de azoto amoniacal extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade.....	52
Figura 31 – Concentração de azoto nítrico extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade.....	53
Figura 32 – Concentração de fósforo extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade.....	53
Figura 33 – Concentração de potássio extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade.....	54
Figura 34 – Concentração de sódio extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade.....	55
Figura 35 – Concentração de cálcio extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade.....	55

Figura 36 – Concentração de zinco extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade.....	56
Figura 37 – Concentração de manganês extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade.....	57
Figura 38 – Concentração de cobre extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade.....	57
Figura 39 – Concentração de ferro extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade.....	58
Figura 40 - Concentração de magnésio extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade.....	58
Figura 41 – Carbono orgânico total nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade.....	59

Índice de Quadros

Quadro 1 – Classificação botânica do manjeriço (Almeida, 2006).....	2
Quadro 2 – Mecanismos de tolerância à salinidade, organizados por processos vegetais e a sua relevância para os três componentes desta tolerância (adaptado de Munns & Tester, 2008).....	10
Quadro 3 – Composição química da mistura solo-substrato.....	15
Quadro 4 – Composição do substrato utilizado no ensaio de crescimento.	16
Quadro 5 – Codificação dos vasos no ensaio e modalidades de tratamento em estudo.....	18
Quadro A1 – Resumo dos efeitos da salinidade por NaCl em plantas de manjeriço, para os parâmetros em estudo.....	I

Lista de Abreviaturas

Abs - Absorvância

APX – ascorbato-peroxidase

CE – condutividade elétrica

CFin – colheita final

CInt – colheita intermédia

COT – carbono orgânico total

EDTA – ácido etilenodiamino-acético

g – aceleração da gravidade da Terra ao nível do mar ($9,806 \text{ m.s}^{-2}$)

ICP-OES – espectrometria de emissão ótica por plasma acoplado indutivamente

MDA – malondialdeído

p – nível de significância

p/v – razão peso-volume

ROS – espécies reativas de oxigénio

TBA – ácido tiobarbitúrico

TCA – ácido tricloroacético

ϵ – coeficiente de absorvidade molar

Ψ_m – potencial matricial do solo

Ψ_o – potencial osmótico

Ψ_T – potencial total

1. Objetivos

A salinidade em excesso no solo é um problema com expressão crescente a nível mundial que pode afetar determinadamente as culturas. A salinidade pode estar associada a práticas agronómicas, mas pode também derivar da salinidade intrínseca dos solos, levando a perdas agronómicas que se revelam complicadas na sua avaliação. A baixa tolerância das culturas a este fator aumenta a sua gravidade.

Como tal, é da maior importância o conhecimento sobre a capacidade de tolerância das diferentes espécies cultivadas e dos mecanismos por detrás desta. São poucos os estudos que incidem sobre os efeitos da salinidade nas lamiáceas (e ainda menos os focados na sua cultura em solo). Este é o caso do manjerição, uma planta com os mais variados usos, desde o alimentar ao cosmético, sendo fonte de compostos aromáticos, antocianinas e óleos essenciais.

A salinidade induz situações de stresse, fruto da ocorrência de condições pouco favoráveis ao desenvolvimento das plantas, que levam a mudanças e respostas na sua fisiologia. As plantas são capazes de desenvolver diversos mecanismos de resistência para contrariar os efeitos indesejáveis causados pelo stress oxidativo gerado nestas condições.

O presente trabalho teve como objetivo a caraterização do efeito do stresse salino sobre o manjerição, tendo sido avaliados os efeitos da salinidade na cultura em solo por contaminação com soluções de cloreto de sódio. Para responder a este objetivo, procedeu-se à realização de ensaios de germinação e crescimento em solos contaminados com soluções de concentrações crescentes de NaCl. O material vegetal foi colhido e realizaram-se medições dos parâmetros de crescimento da planta e sua produtividade tais como a biomassa, a fração de matéria seca, o número de folhas por planta e o teor de clorofila das folhas. Foi também caraterizada a composição mineral da planta. Foram analisados indicadores bioquímicos de stresse oxidativo, em amostras de folhas, os níveis de peróxido de hidrogénio e malondialdeído, teor de proteína solúvel das folhas, a concentração de prolina e açúcares solúveis (atuam como reguladores do equilíbrio osmótico). Outros parâmetros do solo como os nutrientes extraíveis (que traduzem a capacidade de utilização de nutrientes no solo pelas plantas) e a composição mineral do solo foram também avaliados.

2. Introdução

2.1 Manjerição

O manjerição, alfavaca ou basilisco, pertence à espécie *Ocimum basilicum* L. e é uma planta herbácea de hábito anual, sendo uma das cerca de 150 espécies de plantas herbáceas deste género (Almeida, 2006) - Quadro 1. A planta tem muitas utilizações, que incluem usos culinários, em saladas e como condimento em pratos de carne e peixe, especialmente na cozinha italiana, mas também na indústria cosmética (Makri & Kintzios, 2008). O manjerição pode também ser usado como planta ornamental ou pelas suas flores comestíveis (Paton *et al.*, 1999), e é uma fonte de antocianinas, óleos essenciais e compostos aromáticos (Simon *et al.*, 1999). Umerie *et al.* (1998) descrevem o uso de um extrato à base de folhas de manjerição como repelente de mosquitos. Ramírez-Santoval *et al.* (2011), apontam ainda para a possibilidade do cultivo do manjerição com vista à recuperação de solos contaminados com pesticidas (as plantas são tolerantes a altos níveis de endossulfano no solo).

Quadro 1 – Classificação botânica do manjerição (Almeida, 2006).

Família	<i>Lamiacea</i>
Subfamília	<i>Nepetoidae</i>
Tribo	<i>Ocimae</i>
Género	<i>Ocimum</i>
Espécie	<i>Ocimum basilicum</i> L.

Dentro da sua variedade, consideram-se duas subespécies principais e dois grupos de cultivares (Almeida, 2006):

- *Ocimum basilicum* subsp. *basilicum*, na qual se encontram os grupos *Latifolium* (cultivares de folha verde) e *Purpureum* (cultivares de folha roxa).
- *Ocimum basilicum* subsp. *minimum* (sin. *Ocimum minimum* L.), onde se incluem as cultivares de folha fina, vulgo, os manjericos.

A quantidade de diferentes plantas associadas ao género *Ocimum*, aliada a fenómenos comuns de hibridização interespecífica e poliploidia em Lamiáceas (Harley *et al.*, 1992) dificultam a classificação das suas diferentes espécies.

Esta é uma planta de climas temperados a temperados-quentes, sendo muito sensível à geada, pelo que a cultura ao ar livre só deve ser instalada após a última geada da primavera e quando a temperatura média do ar for superior a 12 °C (Almeida, 2006).

A cultura propaga-se por sementeira, em cama quente, em março (Gardé & Gardé, 1988), ou em tabuleiros alveolados, de janeiro a março, para ser transplantada entre março e maio (Almeida, 2006). A gama de temperaturas ótima de crescimento situa-se entre os 15 e 25 °C. A planta prefere solos francos, ricos em matéria orgânica e com boa drenagem, sob condições de dias-longos (Almeida, 2006). Para a germinação, o intervalo de temperaturas ideal dia/noite é de 24 – 27 °C/19 – 22 °C, germinando entre temperaturas de 18 – 30 °C/13 – 25 °C (Putievsky, 1983).

Os compassos geralmente utilizados são de 50 a 70 cm na entrelinha e de 20 a 25 cm entre plantas, mas na cultura em estufa, armada em camalhões, a entrelinha pode ser reduzida para 35 cm (Almeida, 2006).

A fertilização de *O. basilicum* foi estudada por vários autores referidos por Sharafzadeh & Alizadeh (2011), em que as recomendações variam entre 104 a 200 kg.ha⁻¹ de azoto, 12 a 100 kg.ha⁻¹ de fósforo e 73 a 120 kg.ha⁻¹ de potássio, de acordo com diferentes tipos de solo, variedades e climas. Almeida (2006) recomenda, para as condições típicas portuguesas, o uso de 100 a 150 kg.ha⁻¹ de azoto, 100 a 140 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ e 100 a 140 kg.ha⁻¹ de K₂O. A fertilização afeta o rendimento em óleos essenciais, consoante a quantidade de azoto e potássio aplicado e a interação entre estes dois elementos (Rao *et al.*, 2007) Segundo Ramezani *et al.* (2010) a aplicação de fósforo resulta num aumento do rendimento em óleos essenciais, mas o peso total e o peso seco da planta mantêm-se inalterados. Taie *et al.* (2010) reportam o aumento da concentração de linalol e borneol no óleo essencial de *O. basilicum*, com decréscimos do conteúdo em estragol e eucaliptol através da fertilização com composto orgânico.

2.2 Respostas fisiológicas e bioquímicas ao stresse salino

2.2.1 Efeitos gerais da salinidade sobre as plantas

A salinidade é uma medida da concentração de todos os sais solúveis no solo ou na água, sendo geralmente expressa através da medição da condutividade elétrica do solo ou água em decisiemens por metro (dS.m⁻¹) ou em milisiemens por centímetro (mS.cm⁻¹). Esta torna-se um problema para a produção vegetal quando a concentração de cloreto de sódio, carbonato de sódio, sulfato de sódio ou sais de magnésio estão presentes em excesso no meio, e os seus efeitos se tornam tanto mais evidentes quanto maior este excesso (Chapman, 1975). De acordo com Greenway & Munns (1980) e Kirby & Mengel (1981), a salinidade afeta negativamente a germinação, inibe a nodulação, retarda o desenvolvimento das plantas e reduz o seu rendimento.

A salinidade no solo tem várias causas, podendo constituir-se como uma característica inerente ao solo, ou dever-se à intrusão de água marinha em zonas costeiras, ao uso de água salina para rega na agricultura e zonas urbanas, a problemas de drenagem em lençóis freáticos, baixa pluviosidade e/ou alta taxa de evaporação – problema magnificado sobretudo nas regiões áridas e semi-áridas (Carter 1975; Shahid & Raman, 2011). Importa aqui distinguir as noções de salinidade e sodicidade, que se podem confundir. A sodicidade relaciona-se com a proporção relativa de Na na água, ou adsorvida na superfície do solo, relativamente à concentração de Ca e Mg, enquanto que a salinidade se refere à concentração de sais no solo ou água de rega suficientemente alta para afetar adversamente a produtividade e/ou qualidade da cultura, independentemente da composição iónica do solo (Läuchli & Grattan, 2012).

O stresse nas plantas refere-se a uma condição na qual a planta é incapaz de expressar o seu potencial genético por inteiro (Läuchli & Epstein, 1990). O stresse salino compreende duas componentes principais: a componente osmótica, que resulta da elevada concentração de sais dissolvidos na solução do solo ou substrato, com redução da disponibilidade de água para a planta, e a componente iónica, relacionada com a toxicidade dos elementos constituintes dos sais sobre as plantas (Figura 1).

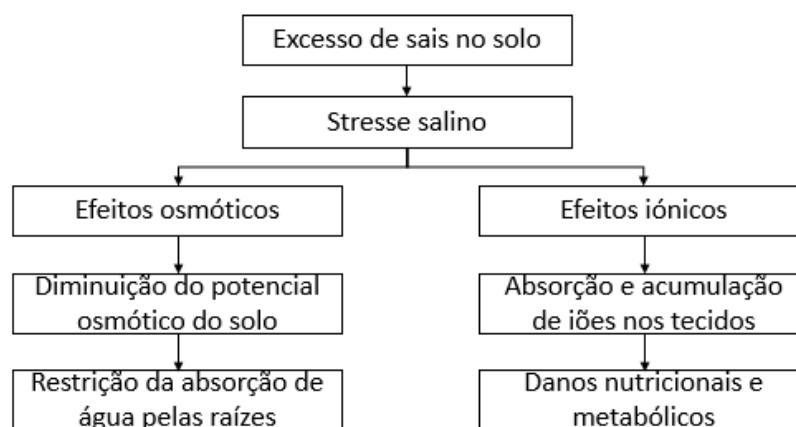


Figura 1 – Principais efeitos do excesso de sais (adaptado de Silveira *et al.*, 2010).

A componente osmótica é a primeira a manifestar-se, causando o fecho dos estomas e a inibição da expansão das folhas devido à redução do potencial hídrico (Munns & Termat, 1986), com uma queda da taxa de crescimento dos rebentos, i.e., novas folhas emergem mais lentamente e o desenvolvimento dos gomos laterais é afetado, pelo que se desenvolvem menos ramos e rebentos laterais (Munns & Tester, 2008).

A presença de sais na solução do solo provoca uma diminuição do potencial osmótico (Ψ_o), que juntamente com o potencial matricial do solo (Ψ_m), constituem as componentes do potencial total com que a água é retirada do solo (Ψ_T). Quanto maior for a concentração de sais no solo, maior será a sua condutividade elétrica (CE, em dS.m^{-1}), menor será o potencial osmótico e menor será o potencial total:

$$\Psi_o = -0,36 \times \text{CE} \quad (1)$$

$$\Psi_T = \Psi_o + \Psi_m \quad (2)$$

A água move-se de regiões de maior potencial para regiões de menor potencial. Logo, a capacidade de absorção da água pelas plantas é tão maior quanto maior for a diferença entre o potencial de água no solo e o potencial no tecido das raízes. Um solo afetado por salinidade apresentará um potencial osmótico menor – a diferença de potencial será reduzida, e assim a capacidade de absorção de água das plantas através das raízes será afetada.

No entanto, nem todas as plantas são igualmente afetadas pelo mesmo nível de salinidade, sendo algumas mais tolerantes que outras. As plantas mais tolerantes são capazes de aumentar a concentração salina no seu interior, de modo a manter um gradiente osmótico favorável para a absorção de água pelas raízes (Dias & Blanco, 2010). O limiar limite de tolerância para a maioria das espécies cultivadas é de cerca de 40 mM NaCl na solução do solo, o que geralmente equivale a uma condutividade elétrica de 4 dS.m^{-1} (Munns & Tester, 2008). Espécies tolerantes durante uma fase do seu desenvolvimento podem ser mais sensíveis durante outras fases. Geralmente, as plantas são mais suscetíveis à salinidade durante a germinação e emergência (Carter 1975).

O stresse osmótico tem um efeito imediato e superior ao da segunda componente da salinidade, associada à toxicidade (Munns & Tester, 2008). Esta resulta numa inibição do crescimento durante vários dias a semanas e numa aceleração da senescência das folhas adultas.

A toxicidade sobre as plantas em ambiente salino é normalmente provocada devido a altas concentrações dos iões cloro e sódio. O cloro é absorvido na forma de ião cloreto (Cl^-), sendo muito móvel na planta, tanto no xilema como no floema. A concentração de cloro necessária às plantas é da ordem de 70 a 700 mg Cl kg^{-1} de matéria seca, mas a maior parte das plantas apresenta teores 10 – 100 vezes superiores (Varennnes, 2003). O principal sintoma de toxicidade deste ião, observável nas plantas, traduz-se por cloroses e necroses nas extremidades e margem das folhas (Varennnes, 2003; Dias & Blanco, 2010). Também se pode verificar amarelecimento prematuro e abscisão das folhas por efeito deste ião (Eaton, 1966; citado por Mengel & Kirby, 1981).

Segundo Munns & Tester (2008), para a maioria das espécies, Na^+ aparenta atingir uma concentração tóxica antes de Cl^- . O teor de sódio nos solos depende fundamentalmente do balanço entre as entradas e saídas do elemento. A rega com água rica em sais é o principal fator responsável pelo enriquecimento em sódio de muitos solos cultivados (Varennnes, 2003).

A sua toxicidade manifesta-se sob a forma de queimaduras ou necrose ao longo das bordas das folhas (Dias & Blanco, 2010). Plantas adaptadas a viver em solos muito ricos em sódio designam-se por halófitas. As plantas não adaptadas a estes meios, as glicófitas, dividem-se em natrofóbicas, quando o ião sódio não substitui o potássio nas funções de osmorregulação e abertura e fecho dos estomas, e em natrofílicas, quando Na^+ substitui K^+ nestas funções (Varennnes, 2003).

A salinidade pode ainda resultar em efeitos indiretos sobre as plantas, associados à interferência do sódio ou outros catiões nas condições físicas do solo, ou na disponibilidade de alguns elementos. O excesso de sódio no complexo de troca no solo pode em condições físicas desfavoráveis para o desenvolvimento radicular e ainda restringir a taxa de mineralização do azoto (Dias & Blanco, 2010).

O efeito dos sais sobre o solo é conhecido e pode-se resumir por alterações na sua estrutura e inclusive perda desta e alteração dos parâmetros físico-químicos do solo, como o aumento da densidade aparente e da retenção de água (Lima *et al.*, 1990; Dias & Blanco, 2010; Pessarakli & Szabolcs, 2011). Solos afetados por salinidade geralmente apresentam baixa atividade biológica devido a efeitos iónicos, osmóticos e à limitação de substratos carbónicos disponíveis, ou seja, matéria orgânica. (Pessarakli & Szabolcs, 2011).

O stresse salino reduz a evapotranspiração das culturas e, deste modo, a sua produção. O crescimento reduzido das plantas devido à salinidade diminui a transpiração, sendo que em certos casos isto se pode dever também ao fecho parcial dos estomas, induzido pelas condições salinas (Allen *et al.*, 1998). O conteúdo em sal da zona radicular varia com a profundidade: aumenta com a profundidade devido às plantas extraírem a água do solo, consequentemente permanecendo os sais num volume de água restante reduzido (Ayers & Westcot, 1985).

2.2.2 Respostas das plantas à salinidade

Nas espécies sensíveis ao stresse salino, o efeito da salinidade manifesta-se por severas reduções do crescimento da planta e alterações na permeabilidade da membrana, na atividade de troca hídrica, condutância estomática, fotossíntese e equilíbrio iónico (Shannon & Grieve, 1999; Navarro *et al.*, 2003; Cabanero *et al.*, 2004). Diferentes processos metabólicos, como a assimilação de CO₂, a síntese proteica, a respiração e a produção de fitohormonas também podem ser afetados pela salinidade (Mengel & Kirby, 1981; Greenway & Munns, 1980).

A redução do crescimento da planta sob stresse salino pode estar associada aos efeitos do excesso de sais sob a homeostase iónica, o balanço hídrico, a nutrição mineral e o metabolismo de carbono fotossintético (Zhu, 2001; Munns, 2002; Munns & Tester, 2008; Dias & Blanco, 2010).

A capacidade das plantas resistirem à toxicidade iónica está ligada à compartimentalização dos iões salinos no interior dos vacúolos e à manutenção de um balanço K/Na no citosol (Silveira *et al.*, 2010).

Na maioria dos casos, genótipos tolerantes à salinidade são capazes de manter altas relações K/Na nos tecidos (Greenway & Munns, 1980; Zeng *et al.*, 2003). O Ca (componente integral da membrana celular) e o Na competem por locais específicos na membrana celular, sendo que nas culturas em solos em que o rácio Na/Ca é elevado observa-se um aumento na permeabilidade da membrana, o que leva à fuga de iões e outros solutos do interior das células, levando ao desequilíbrio osmótico (Orcutt & Nielsen, 2000).

Deste modo, o estado nutricional das plantas assume relevante importância para caraterizar a sua tolerância à salinidade. A aplicação de K e Ca pode contribuir para a manutenção das relações K/Na e Na/Ca, como reportado por Rubio *et al.* (2003), em plantas de pimento, por Cuartero & Muñoz (1999) em tomateiro e Chow *et al.* (1990) em espinafre.

Grattan & Grieve (1999) afirmam que a salinidade dominada por iões Na reduz a disponibilidade de Ca para a planta e reduz o seu transporte e mobilidade para as regiões em crescimento da planta. Huang *et al.* (2007) reportam a diminuição da acumulação de K, Ca e Mg em plantas de cevada sujeitas a condições de stresse salino.

Phills *et al.* (1979), afirmam que altas concentrações de NaCl na solução nutritiva resultaram na inibição da absorção de nitratos (NO₃⁻) em tomateiro, enquanto que Cerezo *et al.* (1997) demonstraram que a absorção de NO₃⁻ em porta-enxertos de laranjeira foi inibida por altas concentrações de Cl⁻.

Em algumas culturas, a salinidade pode inibir a capacidade de redução de nitratos, por diminuição da atividade das enzimas nitrato-reductases (Ullrich, 2002). A inibição da absorção de nitratos pode estar associada à interação NO_3/Cl nos locais de absorção (Suhayda *et al.*, 1990; Deane-Drummond & Glass, 1983), ou à despolarização da membrana pelo Na (Suhayda *et al.*, 1990). A forma de aplicação da fertilização azotada influencia a absorção deste nutriente. Botella *et al.* (1997) observaram que a salinidade diminuiu a taxa de absorção de nitratos, mas teve pouco efeito sobre esta para o caso da aplicação de azoto somente na forma amoniacal (NH_4^+) em plantas de trigo.

Contudo, a aplicação de nutrientes em doses superiores pode não se traduzir diretamente em efeitos significativos para as culturas sob stresse salino. Grattan & Grieve (1999) verificaram que muitos estudos que dizem respeito ao efeito da fertilização em plantas sob este tipo de pressão foram conduzidos em condições de deficiência em N, P ou K – os efeitos benéficos das altas doses de nutrientes derivarão então dessa situação de carência, e não propriamente da condição de salinidade.

Dias & Blanco (2010) apontam para as controvérsias sobre a eficiência da aplicação de nutrientes em excesso de modo a aumentar a tolerância das culturas à salinidade, afirmando, no entanto, que plantas bem nutridas toleram melhor a salinidade do que plantas com carência de um ou mais nutrientes. Blanco & Folegatti (2008), não verificaram efeitos de tratamentos com doses elevadas de N e K sob os componentes de produção e qualidade do fruto em plantas de tomateiro.

De lembrar ainda que os próprios fertilizantes tenderão a aumentar a salinidade do solo, pelo que a sua aplicação em doses supra-ótimas poderá revelar-se contraproducente em muitos casos.

Tester & Davenport (2003) sugerem a existência de dois grupos de tolerância: (1) tolerância individual das células, envolvendo fenómenos como a compartimentação intracelular e a sinalização bioquímica, e (2) tolerância a um nível superior, envolvendo o controlo da absorção e transporte interno de sais e a acumulação de Na no interior da planta. Greenway & Munns (1980) distinguem três tipos principais de adaptações observadas e possíveis em plantas halófitas (Figura 2).

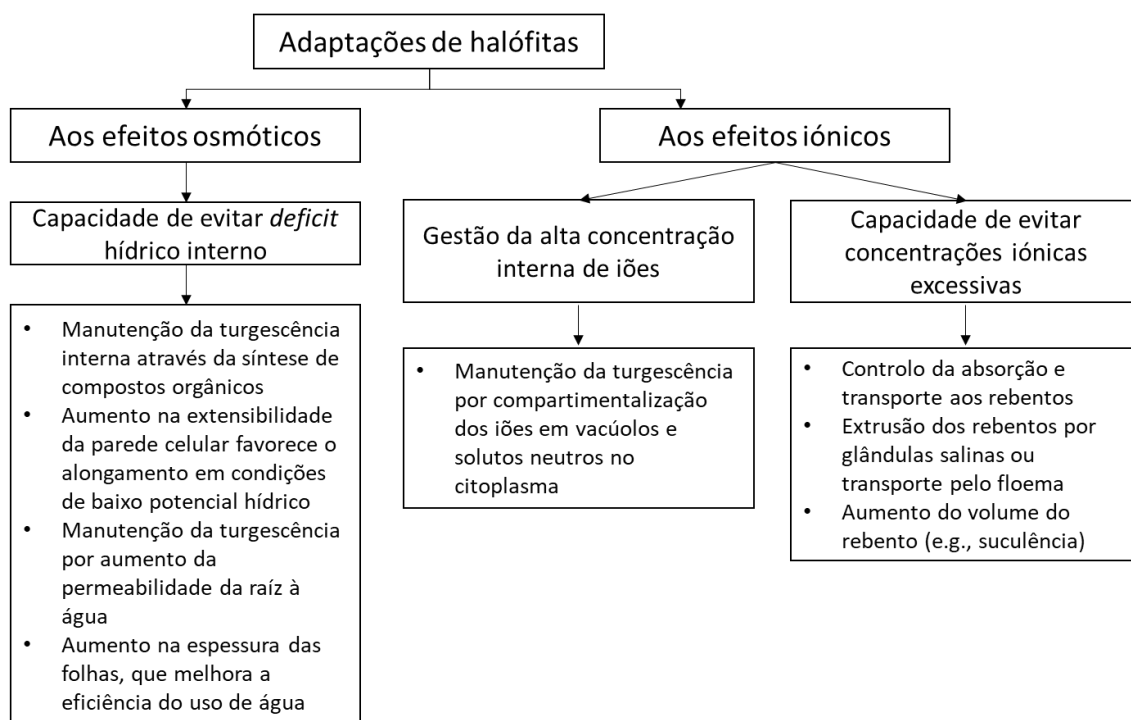


Figura 2 – Adaptações de plantas halófitas a condições de elevada salinidade (adaptado de Greenway & Munns, 1980).

Por sua vez, as plantas sensíveis à salinidade, ou glicófitas, tendem a ser capazes de excluir os sais aquando da absorção da solução do solo, mas não de realizar o ajuste osmótico necessário através da síntese de compostos orgânicos ou de outros mecanismos de resistência/tolerância (Dias & Blanco, 2010).

O desenvolvimento das plantas em condições de salinidade baixa a moderada, entre 2 a 4 dS.m⁻¹ na solução do solo não é afetado de forma a que estas não consigam completar o ciclo vegetativo, mas a salinidade acaba por se repercutir na produtividade. Isto deve-se principalmente a uma menor capacidade de utilização da água, devido à redução da taxa respiratória, consequência do aumento da resistência estomática e menor taxa fotossintética (Silveira *et al.*, 2010).

Os 3 componentes de tolerância introduzidos por Greenway & Munns (1980) e processos da planta, são revistos por Munns & Tester (2008) e esquematizados no Quadro 2.

Quadro 2 – Mecanismos de tolerância à salinidade, organizados por processos vegetais e a sua relevância para os três componentes desta tolerância (adaptado de Munns & Tester, 2008).

	Stresse osmótico	Stresse iónico	
Processo envolvido	Tolerância osmótica	Exclusão de Na ⁺	Tolerância a nível dos tecidos
Deteção e sinalização nas raízes	Modificação da sinalização a longa distância	Controlo do balanço do transporte do ião para os rebentos	Controlo do armazenamento nos vacúolos
Crescimento dos rebentos	Diminuição da inibição da expansão celular e desenvolvimento dos gomos laterais	Não aplicável – os iões não se acumulam até níveis tóxicos em tecidos em crescimento	Retardamento na senescência de folhas adultas
Fotossíntese	Diminuição do fecho estomático	Capacidade de evitar a toxicidade do ião nos cloroplastos	Retardamento da toxicidade iónica nos tecidos
Acumulação de Na ⁺ nos rebentos	Aumento do ajuste osmótico	Redução no transporte a longa distância de Na ⁺	Redução energética na exclusão de Na ⁺
Acumulação de Na ⁺ nos vacúolos	Aumento do ajuste osmótico	Aumento do sequestro de Na ⁺ nos vacúolos das raízes	Aumento do sequestro de Na ⁺ nos vacúolos foliares
Acumulação de solutos orgânicos	Aumento do ajuste osmótico	Alterações no processo de transporte para reduzir a acumulação de Na ⁺	Acumulação de altas concentrações de solutos compatíveis no citoplasma

Em condições de stresse as plantas podem contrariar o desequilíbrio osmótico pela produção de osmoprotetores ou solutos compatíveis (Yancey *et al.*, 1982). Estes osmoprotetores atuam como osmólitos orgânicos, que são solutos usados pelas células de numerosos organismos e tecidos sujeitos a stresse hídrico de forma a manter o volume celular (Yancey, 2005). Os osmoprotetores ou solutos compatíveis distinguem-se em três tipos principais: (1) prolina e ectoína (aminoácidos), (2) betaínas (aminoácidos totalmente N-metilados) e (3) polióis e trealose (açúcares não redutores) – (Khan *et al.*, 2009).

2.2.3 Stresse oxidativo

Sob condições normais de desenvolvimento, a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS – Reactive Oxygen Species) nas células das plantas é relativamente baixa mas importante, dado que as ROS atuam na sinalização celular e no controlo da expressão génica (May *et al.*, 1998; Møller *et al.*, 2007).

As situações de stresse causam nas plantas desequilíbrios nos níveis de ROS por diversos processos fisiológicos.

Em alguns casos os ROS formam-se diretamente nas vias metabólicas em quantidades mais elevadas, em outros resultam de danos moleculares em que a consequência indireta é a formação de ROS, perturbam a homeostase celular e os processos de remoção não são suficientes para os eliminar, existindo em quantidades superiores aos níveis normais (Polle, 2001). Como exemplo de situações de stresse pode-se referir excesso de luz solar, excesso ou carência de água e nutrientes essenciais, exposição a contaminantes, a temperaturas demasiado altas ou baixas, patógenos, entre outros.

A redução da taxa fotossintética aumenta a formação de ROS, e consequentemente aumenta a atividade de enzimas que em vias metabólicas específicas participam na sua remoção (Sharma *et al.*, 2012; Apel & Hirt, 2004). As ROS são moléculas diversas como os superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), radicais hidroxilo (HO^{\cdot}) e o singlete de oxigénio (1O_2).

O stresse oxidativo, ao induzir a formação de ROS em elevada quantidade, promove reações oxidativas capazes de danificar alguns componentes essenciais dos tecidos da planta, através de processos de peroxidação lipídica, oxidação proteica, inibição enzimática e danos no DNA e RNA (Apel & Hirt, 2004; Møller *et al.*, 2007) – Figura 3.

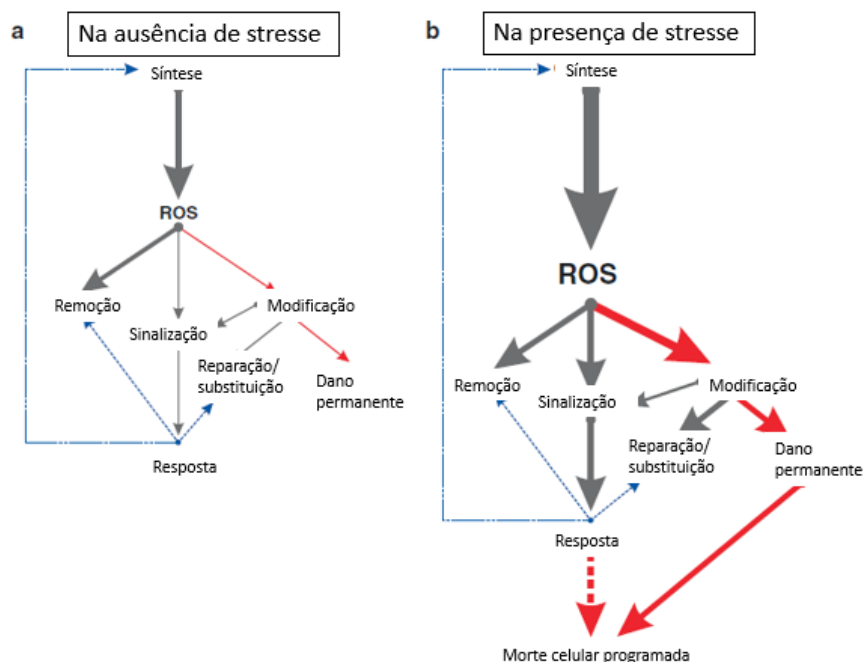


Figura 3 – Relação entre a produção de ROS, sua remoção, modificação, sinalização e dano provocado em células vegetais na ausência de stresse (a) e na sua presença (b) nas condições do meio (Adaptado de Møller *et al.*, 2007). A seta de “Modificação” para “Sinalização” indica que algumas das moléculas modificadas são moléculas de sinalização secundária.

O stresse salino está associado a um aumento da produção de ROS (Chawla *et al.*, 2012; Amor *et al.*, 2005), mas não se traduz na síntese de quaisquer ROS ou antioxidantes específicos identificados (Apel & Hirt, 2004). Contudo, é conhecido que a salinidade reduz a taxa fotossintética e, assim, o fornecimento de CO₂ às células, levando à diminuição da relação CO₂/O₂ no cloroplasto. Isto provoca o aumento do poder fotorredutor, causando um excesso de energia eletroquímica na membrana, que gera ROS como O₂⁻, H₂O₂ e HO[•] (Pérez-López *et al.*, 2009; Amor *et al.*, 2005). Vários autores reportam o aumento de ROS sob stresse salino (Sekmen *et al.*, 2007, em *Plantago media*; Sgherri *et al.*, 2007 e 2008, em tomate; Bor *et al.*, 2003, em beterraba sacarina).

Quando as plantas se ajustam a alterações no seu ambiente suportam transformações bioquímicas que previnem danos nos fotossistemas. Por exemplo, em condições de excesso de luz as plantas evitam a fotoinibição por dissipação do calor pelas xantofilas e pela transferência de eletrões para outros aceitadores que não a água, controlando dessa forma a formação de ROS e consequentemente o seu aumento intracelular. Este processo exige uma regulação a nível superior do sistema antioxidante, seja através de sistemas enzimáticos chave para regular os níveis de ROS, como a superóxido-dismutase, ascorbato-peroxidases, catalases e várias outras peroxidases, seja através de antioxidantes não enzimáticos, como o ácido ascórbico, flavanóides, glutaniona e componentes lipossolúveis como os carotenoides e o α-tocoferol (Munns & Tester, 2008; Møller *et al.*, 2007; Hayat *et al.*, 2012).

As ROS degradam os ácidos gordos polinsaturados, formando malondialdeído (MDA) (Pryor & Stanley, 1975). Como tal, o MDA, produto da peroxidação lipídica, é vulgarmente utilizado como indicador do stresse salino. Os níveis de MDA nos tecidos das plantas sensíveis ao stresse salino tendem a aumentar, mas em plantas tolerantes pode não se verificar aumento da síntese de MDA, ou pode mesmo verificar-se a sua diminuição, quando expostas a condições de elevada salinidade (Amor *et al.*, 2005; Sekmen *et al.*, 2007).

O stresse oxidativo pode resultar no aumento de produção ou da atividade de enzimas como a superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, peroxirredoxinas, dentre outras, assim como proteínas com funções de proteção, por vezes designadas como chaperonas, que assistem no enrolamento e dobragem das proteínas em formas funcionais (Møller *et al.*, 2007; Kosová *et al.*, 2013). É um facto conhecido que plantas sob stresse podem acumular proteínas de baixa massa molar que são utilizadas como fontes de reserva de azoto. Estas proteínas podem ser mobilizadas aquando do alívio ou remoção do stresse (Neto *et al.*, 2009; Mansour, 2000).

A acumulação de compostos contendo azoto correlaciona-se ainda com a tolerância das plantas à salinidade, estando associada ao ajuste osmótico, proteção de macromoléculas celulares, manutenção do pH no interior da célula, desintoxificação das células e sequestro de radicais livres (Mansour, 2000; Kosová *et al.*, 2013).

2.2.4 Osmoprotetores como indicadores de stresse salino

A salinidade pode provocar modificações no metabolismo e acumulação de aminoácidos (Ullrich, 2002). A acumulação de prolina em vários organismos inicia-se com uma redução no potencial de água dos tecidos e células. Esta acumulação pode dever-se a alterações em um dos vários componentes do potencial total: potencial matricial (devido a efeitos da matriz, como tensões superficiais), potencial hídrico e potencial osmótico (Aspinall & Paleg, 1981).

Para além de atuar como osmólito, a prolina pode ainda funcionar como quelante de metais, molécula de sinalização e promotor da atividade de enzimas antioxidantes, sobretudo sobre o singlete de oxigénio ($^1\text{O}_2$) e radicais livres hidroxilo (HO^\bullet) (Hayat *et al.*, 2012; Matysik *et al.*, 2002).

A via metabólica da síntese de prolina é ativada durante processos de desidratação, sendo nestas condições o seu catabolismo inibido, resultando no aumento da concentração de prolina durante condições de stresse hídrico ou salino. Após reidratação, a degradação deste aminoácido é de novo induzida (Hayat *et al.*, 2012).

A acumulação de prolina aparenta estar ligada ao stresse osmótico em geral e não ao efeito de sais específicos (Munns, 2002). Heidari *et al.* (2011), reportam o aumento do teor de prolina livre em folhas de manjerição sujeitas a stress salino. Adolf *et al.* (2013) compilam as conclusões de vários estudos que demonstram o papel da acumulação de prolina como um dos mecanismos de tolerância ao stresse salino em quinoa (*Chenopodium quinoa*).

Greenway & Munns (1980) sugeriram que a glicinabetaína desempenha um papel adaptativo importante em algumas plantas halófitas. Sakamoto & Murata (2000) referem que esta molécula pode estar envolvida na proteção de macrocomponentes das células vegetais, como complexos proteicos e membranas, sob condições de stresse. A glicinabetaína mantém o balanço hídrico entre as células vegetais e o meio e estabiliza macromoléculas sob condições de alta salinidade e desidratação celular (Khan *et al.*, 2009). Robinson & Jones (1986), demonstraram que este aminoácido se acumula nos cloroplastos de plantas de espinafre e beneficia o ajustamento osmótico durante condições de stresse salino.

Diversos outros solutos são importantes no ajustamento osmótico das espécies vegetais, destacando-se os açúcares solúveis (sacarose e glucose), manitol e trealose, entre outros (Silveira *et al.*, 2010). A sacarose e a glucose podem atuar como substratos para a respiração celular ou como osmólitos para a manutenção da homeostase celular (Gupta & Kaur, 2005), enquanto que a frutose não está relacionada com a proteção osmótica, aparentando relacionar-se com a síntese de metabolitos secundários (Rosa *et al.*, 2009). Nemati *et al.* (2011), reportam um aumento da concentração de açúcares solúveis em rebentos de plântulas de um genótipo tolerante de arroz. Anower *et al.* (2017) também reportam o aumento do teor destes açúcares em rebentos e raízes de luzerna (*Medicago sativa*) sob stresse salino.

3. Material e Métodos

3.1 Ensaio de germinação e crescimento em meio de salinidade elevada

Os ensaios de germinação e crescimento decorreram no Horto de Química Agrícola, do Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem (LEAF) do Instituto Superior de Agronomia, em Lisboa. O ensaio de germinação permitiu fazer uma avaliação da influência da salinidade do meio na capacidade germinativa e no tempo médio de germinação. O ensaio de crescimento em meio de salinidade elevada permitiu fazer uma avaliação da influência da salinidade no desenvolvimento das plantas.

Para o ensaio de germinação, foram colocadas 20 sementes de manjerição por vaso (variedade italiana de folha larga – *Ocimum basilicum* L. var. *latifolium*) e avaliada a capacidade germinativa para os solos contaminados com diferentes condutividades elétricas após a germinação. Cada vaso foi regado com 200 mL de água desionizada antes da sementeira, de modo a que no início do ensaio o solo se encontrasse à capacidade de campo. Usaram-se 20 vasos no total do ensaio, 4 vasos para cada uma das 5 modalidades de condutividade (incluindo a modalidade “Controlo”). Os vasos contiveram 2 kg de solo argiloso da Tapada da Ajuda e substrato (80 % e 20 % do peso total, respetivamente). Segundo a carta dos solos de Portugal (Cardoso *et al.*, 1971), a parcela de onde o solo foi recolhido encontra-se numa mancha de solos do tipo vertissolos crómicos, distinguidos por um elevado teor de argilas, dentre as quais, esmectites, que lhe oferecem características como a dureza e fendas de retração quando secos e viscosidade e comportamento plástico quando húmidos. No Quadro 3 encontra-se a composição química da mistura solo-substrato. A composição do substrato, segundo o fabricante, está detalhada no Quadro 4. Os vasos foram cobertos de forma a conservar a água no solo (Figura 4). A temperatura ambiente situou-se entre os 22 e 24 °C.

Quadro 3 – Composição química da mistura solo-substrato.

CE	pH (H ₂ O)	COT	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	P	K	Na	Ca	Mg	Fe	Zn	Mn	Cu
μS.m ⁻¹		%	mg.kg ⁻¹										
688,8 ± 22,2	6,06 ± 0,05	5,2 ± 0,3	4,9 ± 1,6	18,1 ± 2,7	122,9 ± 26,2	161,7 ± 13,4	80,2 ± 5,8	3316,7 ± 446,9	952,5 ± 46,9	196,3 ± 14,0	4,5 ± 0,9	199,9 ± 5,2	9,1 ± 0,2

Os valores precedidos de ± indicam o desvio padrão. A determinação da concentração dos elementos minerais foi realizada sobre a fração extraível.

Quadro 4 – Composição do substrato utilizado no ensaio de crescimento.

Parâmetros	Valores fornecidos
pH em CaCl_2	5,5 – 6,5
Humidade	50 – 60 %
Condutividade elétrica	0,6 – 1,5 dS/m
N	100 – 250 mg/L
P (em P_2O_5)	100 – 250 mg/L
K (em K_2O)	200 – 350 mg/L
Matéria Orgânica	> 90 %



Figura 4 – Ensaio de germinação na câmara interior do Horto.

Para o ensaio de crescimento, as plantas de manjerição germinaram em turfa *Jiffy 7* em alvéolos em câmara de crescimento Fitoclima (*Aralab*) a 25 °C e humidade relativa de 65 % (Figura 5), tendo sido transplantadas com 3 a 4 folhas para os vasos contendo o solo contaminado (os mesmos vasos do ensaio de germinação) 20 dias após a germinação.

A rega efetuou-se com recurso a água desionizada, administrada de modo a que o teor de água no solo não descesse abaixo da reserva útil, de modo a garantir que eventuais resultados pudessem ser confundidos com efeitos de stresse hídrico, devido a rega deficitária.



Figura 5 – Crescimento das plantas de manjeriço em câmara de crescimento com condições controladas.

A contaminação do solo realizou-se através da preparação de soluções salinas (NaCl) de diferentes concentrações e da sua adição ao solo e substrato usados. A cada vaso foram adicionados 300 mL das diferentes soluções salinas (Quadro 5).

Foram ainda adicionados 50 mL de solução de sulfato de amónio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e 50 mL de solução contendo hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) e cloreto de potássio (KCl), como fertilização de fundo, perfazendo um total de 400 mL por cada vaso. Para além da fertilização de fundo, foram efetuadas ainda duas adubações de sulfato de amónio (concentração e volume idênticos) de cobertura.

A solução nutritiva azotada foi preparada com 1,1785 g de sulfato de amónio por cada 50 mL de solução (0,17 M). A solução nutritiva contendo fósforo e potássio foi preparada com 0,9563 g de KH_2PO_4 (0,14 M) e 0,269 g de KCl (0,26 M).

Os vasos foram dispostos de forma aleatória e rodadas as suas posições ao longo do decorrer do ensaio (Figura 6) na zona coberta do Horto, expostos à luz solar, mas não à chuva. Foram identificados segundo a codificação descrita no Quadro 5.



Figura 6 – Disposição dos vasos em bancadas rotativas durante o ensaio de crescimento.

Quadro 5 – Codificação dos vasos no ensaio e modalidades de tratamento em estudo. No quadro são apresentados os valores médios da medição da condutividade elétrica para os quatro vasos de cada modalidade.

Vasos	Condutividade elétrica (dS.m ⁻¹)	Concentração de NaCl na solução de contaminação (mM)
A1 a A4	Controlo (sem adição de NaCl) – 1,3	0
B1 a B4	2,8	68,4
C1 a C4	4,6	136,9
D1 a D4	8,3	273,8
E1 a E4	13,4	513,3

A primeira colheita de material vegetal (colheita intermédia) e a segunda (colheita final) tiveram lugar 18 e 32 dias após o transplante, respetivamente. Foram colhidas 16 plantas de cada modalidade na colheita intermédia e nove na final, à exceção de casos em que houve mortes de plantas (modalidades de 8,3 e 13,4 dS.m⁻¹), para os quais foi possível apenas colher uma a duas plantas por vaso. O material recolhido na colheita intermédia foi pesado e deixado 7 dias em estufa a 80 °C, para posterior pesagem, maceração e digestão para a determinação do conteúdo mineral. O material recolhido na colheita final teve o mesmo fim, sendo que parte das folhas foi congelada de imediato em azoto líquido e conservada em arca a -80 °C para posteriores análises bioquímicas sobre o material fresco (ver 3.2). Em cada colheita foi medido o teor de clorofila das folhas. As plantas foram separadas do substrato e foi determinada a sua massa total individualmente, assim como dos caules, das folhas e das raízes de cada planta (das raízes apenas para a colheita final). A primeira fertilização de cobertura foi realizada 18 dias após a transplantação e a segunda 30 dias após a transplantação.

3.2 Determinações analíticas em plantas

3.2.1 Determinação da capacidade germinativa e tempo médio de germinação

No final do ensaio de germinação, que decorreu ao longo de 10 dias, foi contabilizado o total das sementes germinadas em cada modalidade de tratamento e calculada a sua proporção em relação à totalidade das sementes distribuída: 20 por vaso, 80 por tratamento. O resultado foi expresso em percentagem (%).

Para além da capacidade germinativa foi ainda avaliado o tempo médio de germinação, que decorreu ao longo de 10 dias. Ao 4º, 7º e 10º dias foram registados o nº de sementes germinadas. Com base nesses dados, foi possível determinar o tempo médio de germinação (\bar{t}), como descrito por Ranal *et al.* (2008):

$$\bar{t} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i t_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

k = último momento de germinação
 n_i = número de sementes germinadas no momento i
 t_i = tempo decorrido desde o começo do ensaio de germinação à i-ésima observação

3.2.2 Determinação do teor de matéria seca dos tecidos vegetais

Após a colheita, as folhas foram separadas dos caules, enxaguadas com água desionizada, e foi registado o peso da matéria fresca. Folhas e caules de cada vaso foram deixados em estufa a 80 °C por 7 dias, sendo posteriormente as amostras pesadas e maceradas para digestão. Também foram recolhidas as raízes da colheita final, sendo sujeitas ao mesmo procedimento. Conhecendo-se a massa do material vegetal fresco aquando da colheita e a sua massa após secagem, foi possível determinar o seu teor de massa seca, considerando que:

$$\% \text{ Matéria Seca} = \frac{\text{Massa de Matéria Seca}}{\text{Massa de Matéria Fresca}} \times 100 \%$$

3.2.3 Determinação do teor de clorofila das folhas

A determinação do teor de clorofila das folhas foi efetuada em ambos os dias de colheita, com recurso ao aparelho *Hansatech – CL01 Chlorophyll Content System*.

Este é um método não destrutivo e os resultados são reportados em unidades adimensionais relativas que variam de 0 a 2000. O teor de clorofila foi medido em 10 folhas de cada modalidade em estudo.

3.2.4 Determinação do conteúdo mineral dos tecidos vegetais

Para a determinação do conteúdo mineral dos tecidos vegetais procedeu-se à sua maceração, pesagem rigorosa de 0,5 g de material vegetal seco e posterior digestão.

As amostras em triplicado para cada modalidade foram digeridas durante um período de tempo superior a duas horas, a temperatura até 105 °C, num digestor *DigiPREP MS*. A cada amostra para digestão foram adicionados 7 mL de ácido nítrico e 2,5 mL de ácido clorídrico.

Os minerais analisados foram o Na, Cu, Ca, K, Mn, Fe e Mg, sendo determinados através de espectrofotometria de emissão ótica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES).

Este procedimento foi efetuado para as amostras de folhas, caules (18 e 32 dias após a transplantação) e raízes (32 dias após a transplantação).

3.2.5 Determinação dos teor de peróxido de hidrogénio nas folhas

O protocolo seguido para a determinação do teor de H₂O₂ foi adaptado do trabalho de Singh *et al.* (2006). Para este objetivo, foram usadas as seguintes soluções:

- Solução tampão fosfato 100 mM, pH 7,6;
- Solução stock 0,16 mM de peróxido de hidrogénio em água desionizada, para a elaboração da curva padrão;
- Solução 0,1 % (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) em água desionizada;
- Solução 1 M de iodeto de potássio (KI) em água desionizada.

Uma amostra em triplicado para cada modalidade de 0,5 g de folhas armazenadas à temperatura de -80 °C foi macerada e extraída com 2,5 mL da solução de TCA descrita e centrifugada a 12500 x g por 15 minutos, tendo sido depois retirado 500 µL do sobrenadante, aos quais se adicionou 500 µL de tampão fosfato e 1 mL de KI. Após agitação, leu-se a absorbância das amostras a 390 nm em cuvetes de plástico. Os resultados foram expressos em em µg H₂O₂.g⁻¹ de peso fresco recorrendo à seguinte equação:

$$[H_2O_2] = \frac{Abs[390] - V_e}{m_a} \times \frac{0,5}{V_s} \quad (\mu g H_2O_2 \cdot g^{-1} \text{ peso fresco})$$

Abs[390]= valor obtido a partir da equação da curva padrão após leitura da absorvância a 390 nm ($\mu g mL^{-1}$);

m_a= massa da amostra utilizada na extração para a determinação do nível de H₂O₂ (0,50 g)

v_e = volume de TCA utilizado na extração para a determinação do nível de H₂O₂ na amostra (2,5 mL);

v_s = volume de sobrenadante utilizado (em mL);

0,5, para entrar em conta com o efeito da diluição, caso não se utilize 0,5 mL de sobrenadante.

3.2.6 Determinação do teor de malondialdeído nas folhas

O protocolo para esta determinação foi adaptado de Demiral & Turkan (2005), que recorreram a um método espectrofotométrico que permite quantificar o MDA enquanto produto da peroxidação lipídica das membranas celulares. Os resultados foram corrigidos para a turbidez inespecífica, por subtração da absorvância registada para cada amostra a 600 nm.

Cada amostra, em triplicado, consistiu em 0,5 g de folhas armazenada a -80 °C, maceradas em conjunto com 2,5 mL de solução de TCA a 1 % (p/v). A solução resultante foi centrifugada a 12500 x g por 15 minutos e o sobrenadante recolhido (1 mL). Ao sobrenadante adicionou-se 4 ml de solução de TCA a 20 % (p/v) e ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,5 % (p/v) em água desionizada.

A solução de amostra foi aquecida a 95 – 100 °C durante 30 minutos, arrefecida rapidamente em gelo, e centrifugada a 10000 x g por 15 minutos. Procedeu-se então à leitura da absorvância das amostras a 532 e 600 nm em cuvetes de vidro.

A concentração de MDA para cada amostra foi obtida pela diferença entre a leitura de absorvância a 532 nm (Abs[532]) e a leitura a 600 nm (Abs[600]), aplicando o coeficiente de absortividade molar do MDA ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$):

$$[MDA]_{mM} = \frac{Abs[532] - Abs[600]}{\epsilon} \text{ (mM)}$$

Convertendo para a concentração em relação ao peso fresco:

$$[MDA] = \frac{[MDA]_{mM} \times 1000}{\text{massa da amostra (g)}} \text{ (mM} \cdot \text{g}^{-1} \text{ peso fresco)}$$

3.2.7 Determinação do teor de proteína solúvel nas folhas

O teor de proteína solúvel nas folhas foi determinado pelo método de Bradford (1976), baseado na alteração da absorvância do corante Coomassie Brilliant Blue G 250.

Em condições ácidas, o corante adquire a cor azul aquando da sua ligação às proteínas e aminoácidos. Esta forma azul é detetada recorrendo à espetofotometria, através da leitura da absorvância da solução de amostra a 595 nm.

O método utilizado requereu o uso de solução tampão fosfato (100 mM), a pH 7, solução de Coomassie a 1 % (p/v) e de solução de albumina de soro bovino (BSA) em tampão fosfato 100 mM a 10 % (p/v). As amostras, em triplicado, foram sujeitas a preparação prévia para a extração da proteína solúvel.

Para a preparação das amostras, maceraram-se 0,5 g de folhas com 2 mL de tampão de extração e 0,02 g de polivinilpolipirrolidona insolúvel a 2 % (p/v).

O tampão de extração utilizado foi constituído por Tris-HCl (100 mM, a pH 7,5), 3 mM de ditioneitol, 1 mM de EDTA e 0,2 % (p/v) de Triton X-100. O extrato resultante foi centrifugado a 12000 x g durante 20 minutos a 4 °C e recolheu-se o sobrenadante límpido. O sobrenadante foi concentrado em sistemas de ultrafiltração e purificação parcial (*Microcon YM 10, Milipore*). Foram colocados 500 µL de sobrenadante no filtro *MicroconUltra* e centrifugou-se a 14000 x g por 15 minutos. O extrato foi então concentrado dez vezes, tendo-se adicionado 300 µL de solução tampão Tris-glicina diluído (1 M, a pH 8,1) e centrifugado nas condições anteriores.

Para a determinação do teor de proteína solúvel, propriamente dita, usou-se 100 µL de extrato obtido pelo procedimento descrito acima em conjunto com 6 mL de solução de Coomassie. Após agitação, leu-se a absorvância da solução resultante a 595 nm. Através da reta da curva padrão, foi possível proceder à quantificação da proteína solúvel nas folhas (0,1 = 0,1 mg = 100 µL de extrato):

$$[\text{Proteína solúvel}] = \frac{Abs[595] \times V_s}{\left(\frac{m_a}{V_e}\right) \times 0,1} \text{ (mg proteína solúvel.g}^{-1} \text{ peso fresco)}$$

Abs[590] = valor obtido a partir da equação da curva padrão após leitura da absorvância a 595 nm (mg.mL⁻¹)

V_s = volume de sobrenadante utilizado na determinação da quantidade total de proteína (100 µL = 0,1 mL)

m_a = massa da amostra utilizada na extração para a determinação da quantidade total de proteína (0,50 g)

V_e = volume de tampão de extração utilizado na extração para a determinação da quantidade total de proteína na amostra (2,0 mL)

× 0,1 mL, quantidade de material vegetal (g) presente em 0,1 mL de extrato

3.2.8 Determinação do teor de prolina livre nas folhas

Esta análise foi realizada com base no método descrito por Demiral & Turkan (2005), que se baseia na reação da ninidrina com o aminoácido, originando um composto corado que é extraído pelo tilueno. A concentração de prolina livre nas folhas foi determinada por leitura da absorvância a 520 nm da solução de amostra, à qual é adicionado o tilueno.

Para esta determinação laboratorial foram preparadas as seguintes soluções, de acordo com o trabalho de Bates (1973):

- Solução 3 % (p/v) ácido sulfossalicílico em água desionizada;
- Solução stock 5 mM de prolina em 3 % (p/v) de ácido sulfossalicílico, para a elaboração da curva padrão.

Foram ainda usadas soluções comerciais de tolueno, ácido acético glacial e solução a 2 % (p/v) de ninidrina.

Uma amostra em triplicado para cada modalidade de 0,5 g de folhas armazenadas a -80 °C foi macerada e extraída com 2 mL da solução a 2 % (p/v) de ninidrina, centrifugada a 12000 x g por 15 minutos e retirado o sobrenadante. A 1 mL de sobrenadante foi adicionado 1 mL de 3 % (p/v) ácido sulfossalicílico, 1 mL de ninidrina e 1 mL de ácido acético glacial e incubou-se durante uma hora em banho-maria a 100 °C, em tubos de vidro tapados.

Os tubos foram rapidamente arrefecidos em gelo, procedimento ao qual se seguiu a adição de 5 mL de solução de tolueno, tendo-se agitado em vórtex 2-3 minutos. A fase menos densa foi recolhida com uma pipeta e lida a sua absorvância a 520 nm em cuvetes de vidro. A concentração de prolina nas folhas é então determinada através da seguinte equação:

$$[\textbf{Prolina livre}] = \frac{\text{Abs}[520] \times V_s}{\left(\frac{m_a}{V_{AC}}\right)} \quad (\mu\text{mol prolina g}^{-1} \text{ peso fresco})$$

Abs[520] = valor obtido a partir da equação da curva padrão após leitura da absorvância a 520 nm ($\mu\text{mol mL}^{-1}$);

V_s = volume de sobrenadante utilizado na determinação da concentração de prolina livre (1 mL);

m_a = massa da amostra utilizada na extração para a determinação do nível de prolina livre (0,50 g);

V_{AC} = volume de ácido sulfossalicílico utilizado na extração para a determinação do nível de prolina livre na amostra (2 mL).

3.2.9 Determinação do teor de açúcares solúveis nas folhas

O teor de açúcares solúveis nas folhas foi determinado pelo método da antrona, baseado na hidrólise das ligações glicosídicas com ácido sulfúrico concentrado, originando monossacáridos que, após a sua desidratação, se convertem em furfural e nos seus derivados. Estes compostos reagem com a antrona e formam um complexo azul-esverdeado cujo máximo de absorvância se situa aos 620 nm.

O método exigiu a extração prévia dos açúcares solúveis, segundo adaptação do procedimento descrito por Chow & Landhäusser (2004). Pesaram-se 0,05 g de folhas congeladas em azoto líquido de cada modalidade de tratamento, amostra em triplicado, aos quais se adicionaram 5 mL de etanol a 80 % e macerou-se. A solução obtida foi centrifugada a 12500 x g durante 15 minutos, sendo o sobrenadante recolhido para a determinação pretendida.

Ao sobrenadante foi adicionado 5 mL de antrona, tendo-se agitado os tubos em banho de água fria. Os tubos foram então tapados e colocados em banho-maria, sendo levados à ebulição por 10 minutos.

Seguiu-se o arrefecimento dos tubos em gelo e a leitura da absorvância das amostras a 620 nm. Através da elaboração da curva de calibração correspondente (sendo os padrões também preparados com solução a 80 % de etanol) e por aplicação do valor determinado para a absorvância das amostras à equação da curva, foi possível determinar a concentração de açúcares solúveis.

3.3 Determinações analíticas no solo

3.3.1 Determinação da condutividade elétrica do solo

A condutividade elétrica do solo foi determinada numa suspensão de solo/água em proporção de 1:2,5, após 1 h de contacto, utilizando um condutímetro *Metrohm model 600*.

3.3.2 Determinação do NPK extraíveis do solo

O fósforo e o potássio extraíveis do solo foram determinados através de leitura de amostras no ICP-OES. Para tal, recolheram-se 2 g de solo de cada vaso, que representam os quadruplicados de cada modalidade, agitando durante duas horas as amostras de solo com 40 mL de solução extrativa de Egner-Riehm (0,1 M de lactato de amónio e 0,4 M de ácido acético) – Balbino (1968). No fim deste período, centrifugaram-se as amostras durante 10 minutos a 3500 x g e 10 mL de sobrenadante foram transferidos para tubos de leitura e lidos no ICP-OES.

O azoto extraível, na sua forma nítrica (NO_3^-) e amoniacal (NH_4^+), foi determinado através de um auto analisador de fluxo segmentado (*Skalar ScanPlus*), como descrito por Houbá *et al.* (1995). A solução de amostra resultou da agitação durante uma hora de 6 g de solo em 30 mL de KCl (2 M) e posterior centrifugação (10 minutos, 3500 x g). Foram então transferidos 10 mL de sobrenadante para tubos de leitura e procedeu-se à leitura das amostras, por espectrofotometria de absorção a 540 nm (NO_3^-) e 660 nm (NH_4^+).

3.3.3 Determinação dos macronutrientes extraíveis do solo

A determinação de macronutrientes extraíveis, ou bases de troca, realizou-se de acordo com o método de Schollenberger & Simon (1945). Retiraram-se de cada vaso 2 g de solo, que foram agitadas com 30 mL de solução de acetato de amónio (1 M, pH 7) por duas horas, seguida de centrifugação a 3500 x g por 10 minutos e recolha de 10 mL de sobrenadante. A quantificação dos elementos minerais realizou-se por leitura no ICP-OES.

3.3.4 Determinação dos micronutrientes extraíveis do solo

A determinação de micronutrientes extraíveis (Fe, Zn, Cu e Mn) foi efetuada recorrendo ao método de extração de Lakanen & Ervio (1971). Retiraram-se de cada vaso 4 g de solo, sendo as amostras agitadas com 40 mL de solução de extração (ácido acético 0,5 M, acetato de amónio 0,5 M e EDTA 0,02 M) por duas horas, seguida de centrifugação a 3500 x g por 10 minutos e recolha de 10 mL de sobrenadante. A quantificação dos elementos minerais realizou-se por leitura no ICP-OES.

3.3.5 Determinação do carbono orgânico total

Para a determinação do carbono orgânico total (COT) recorreu-se a um analisador multiEA400 (*Analytik Jena AG*). Colocaram-se 0,3 g de amostra de solo (amostra em triplicado para o solo antes da contaminação e em quaduplicado após a contaminação, para cada modalidade) em forno de combustão a alta temperatura (1100 °C), o que oxidou o carbono a CO₂, na presença de oxigénio. As amostras atravessaram um condesador Peltier após a reação de oxidação, o que removeu a humidade formada por condensação. O CO₂ do gás resultante foi quantificado por um detetor de infravermelhos não dispersivo para o carbono total, e o seu valor expresso em percentagem (%).

3.4 Tratamento Estatístico

Para o tratamento estatístico recorreu-se à análise de variâncias (ANOVA a um fator – salinidade, traduzida através da condutividade elétrica do solo), de modo a verificar-se a influência do fator nas variáveis dependentes e se as médias para os resultados de cada modalidade de salinidade variaram significativamente.

A comparação das médias realizou-se através do teste de Tukey, com um grau de confiança de 95 % ($p < 0,05$). Para tal, recorreu-se ao software estatístico *R*.

4. Resultados e Discussão

4.1 Efeitos do stresse salino na germinação

Na Figura 7 apresentam-se os resultados do efeito do stresse salino na germinação das plantas de manjeriço. Os vasos pertencentes à modalidade de controlo ($1,3 \text{ dS.m}^{-1}$) foram os que apresentaram maior capacidade germinativa. Na modalidade B a taxa germinativa desce 28 % abaixo da taxa padrão e para a modalidade C diminui para níveis altamente debilitantes para o uso (redução de 89 % em relação ao controlo). Para as modalidades D e E não se registou qualquer ocorrência de germinação. Observou-se um efeito significativo ($p < 0,05$) dos níveis de salinidade sobre a capacidade germinativa das sementes, conforme a análise de variâncias.

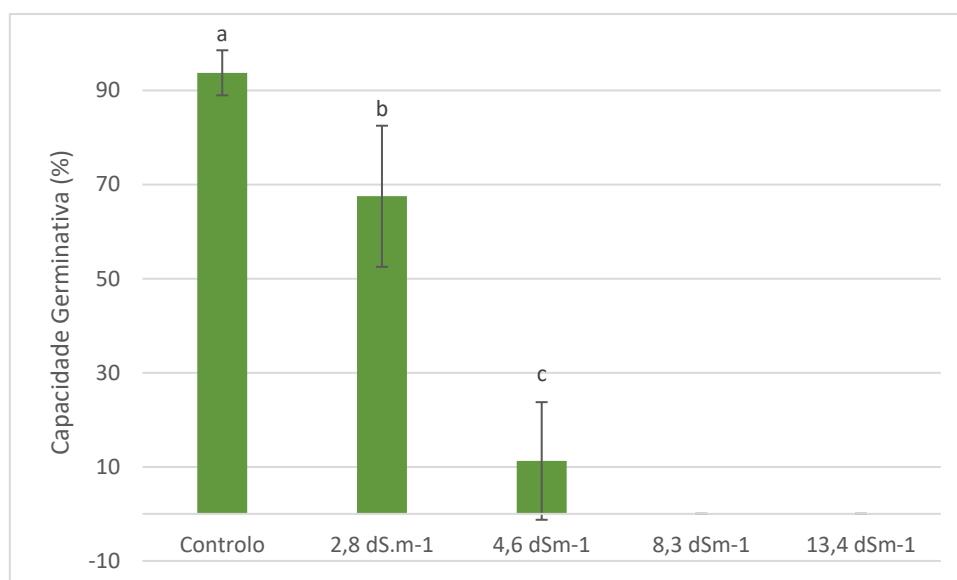


Figura 7 – Capacidade germinativa em sementes de manjeriço expostas a diferentes níveis de salinidade no solo. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão.

A inibição da germinação em sementes de manjeriço causada pelo aumento da salinidade no meio de germinação já tinha sido observada por Tilebeni (2011), afetando a mobilização da reserva da semente, contida nos cotilédones, embora o stress salino não tenha tido efeito na eficiência de conversão da reserva que foi mobilizada. Esta inibição foi também verificada por Miceli *et al.* (2003), Ramin (2006), Mousavi & Jouyban (2011) e Carvalho *et al.* (2016).

Ramin (2006) classifica o manjerição como moderadamente tolerante à salinidade na germinação e emergência da plântula. Contrariamente, no presente trabalho, os resultados obtidos indicam que a cultura é sensível á salinidade na germinação, verificando-se um efeito significativo deste parâmetro sobre a taxa germinativa e que este parâmetro decresce em maior grau para semelhantes condições salinas. No entanto, há que ter em conta que estes foram ensaios realizados em condições experimentais substancialmente diferentes. Os resultados referidos por Ramin (2006) resultam de ensaios em que a germinação foi realizada em papel de germinação e água desionizada, enquanto que neste trabalho se avaliou a germinação em solo, reproduzindo as condições de obtenção em que são obtidas as plantulas. O método utilizado no trabalho de Ramin (2006) facilita a germinação, acelerando a sua primeira etapa, a embebição, na qual a semente absorve água que leva ao aumento de volume e quebra do tegumento.

O decréscimo da capacidade germinativa pode dever-se ao baixo potencial osmótico que se estabelece em condições salinas e restringe a embebição, ou a efeitos tóxicos dos iões dos sais, neste caso, Na^+ ou Cl^- . O excesso destes iões tende a causar a diminuição da intumescência protoplasmática, afetando a atividade enzimática e resultando principalmente na produção inadequada de energia por distúrbios na cadeia respiratória (Moraes *et al.*, 2005).

Os resultados apresentam-se na Figura 8. Apesar de o tempo médio de germinação ter sido inferior para a modalidade de controlo e superior para as modalidades de tratamento em que ocorreu germinação (2,8 e 4,6 dS.m⁻¹), a análise de variâncias não revelou, nem um efeito da salinidade sobre este parâmetro, nem diferenças significativas entre as médias para cada modalidade. Estes resultados não estão concordantes com os de Miceli *et al.* (2003), que observaram um aumento significativo do tempo médio de germinação, fruto do aumento da salinidade. Estes autores usaram um número menor de sementes para cada modalidade (50, por oposição às 80 sementes usadas neste trabalho), mas registaram diariamente o número de sementes germinadas, o que possivelmente terá contribuído para uma menor variância deste parâmetro.

A influência significativa da salinidade neste parâmetro foi também observada em outras plantas aromáticas como a rúcula (*Eruca sativa* L.) e a salsa (*Petroselinum hortense* Hoffm.), no mesmo trabalho referido, e em cominho (*Cuminum cyminum* L.), por Mohammadizad *et al.* (2014).

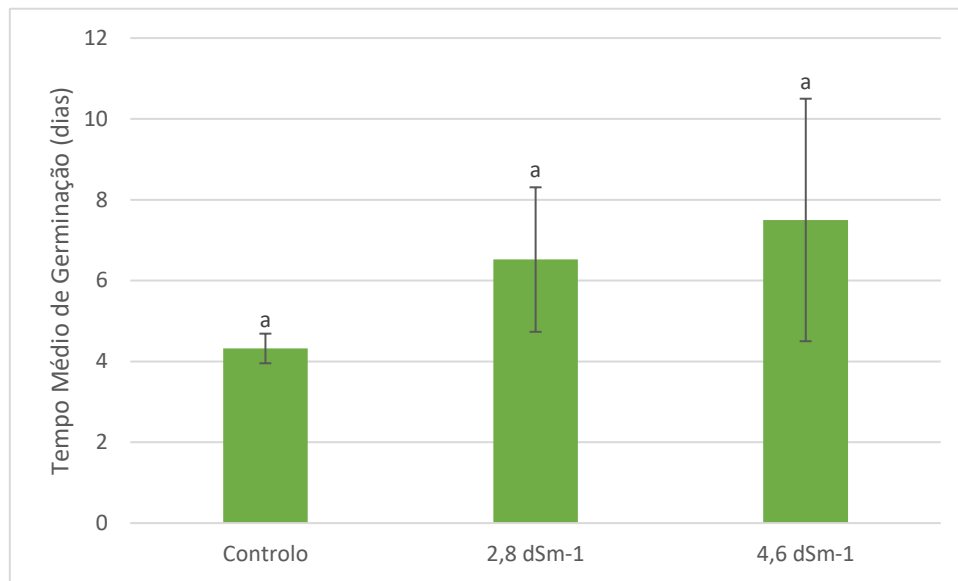


Figura 8 –Tempo médio de germinação de sementes de manjerição expostas a diferentes níveis de salinidade no solo. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão.

CONCLUSÕES INTERCALARES:

A salinidade teve um efeito significativo sobre a capacidade germinativa das sementes, mas não sobre o tempo médio de germinação, embora se tenha registado valores superiores do tempo médio de germinação em relação ao controlo em ambas as modalidades de tratamento em que ocorreu germinação.

Verificou-se que para uma condutividade elétrica do solo superior a 4,6 dS.m⁻¹ não houve germinação. Para os meios com teor salino em que houve germinação verificou-se que esta decorreu em tempos crescentes, proporcionais aos teores salinos do solo.

4.2 Ensaio de crescimento

Durante o ensaio de crescimento verificou-se que o crescimento das plantas de manjerição foi inibido em relação ao controlo, sendo esta inibição tanto maior quanto maior a condutividade elétrica do solo (Figuras 9 e 10).

Como observado nestas figuras, o crescimento aparenta ter sido mais afetado para os solos com maior grau de contaminação por NaCl, sendo que nas modalidades de tratamento de 8,3 (D) e 13,4 dS.m⁻¹ (E) se registaram inclusive plantas mortas. Observaram-se aparecimentos de clorose (Figura 11) e abscisão de folhas (nas plantas sujeitas a 13,4 dS.m⁻¹ e em casos esporádicos nas sujeitas a 8,3 dS.m⁻¹), o que sugere que, pelo menos em parte, a toxicidade do NaCl terá afetado o desenvolvimento das plantas. A clorose no manjerição pode ser confundida com míldio ou fusariose, mas, para além da murchidão, que será consequência da diminuição da capacidade da planta para absorver água devido à redução do potencial osmótico, nenhuma planta exibiu quaisquer outros sintomas de infeção por estas doenças, que são descritos em Garibaldi *et al.* (1997).

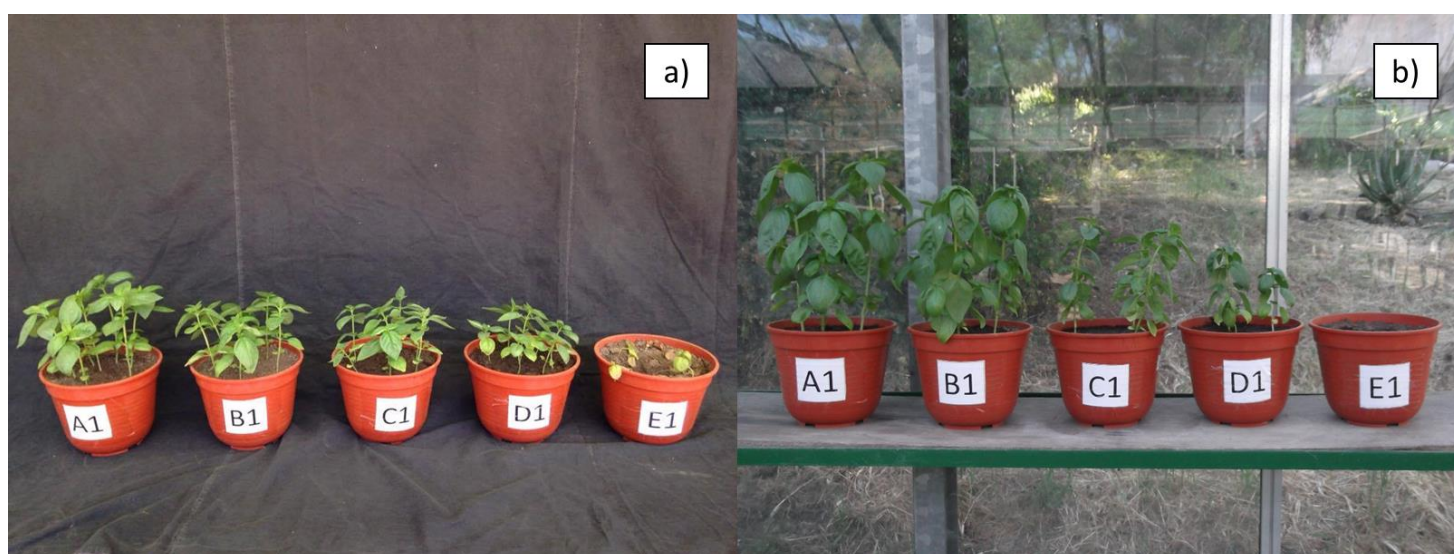


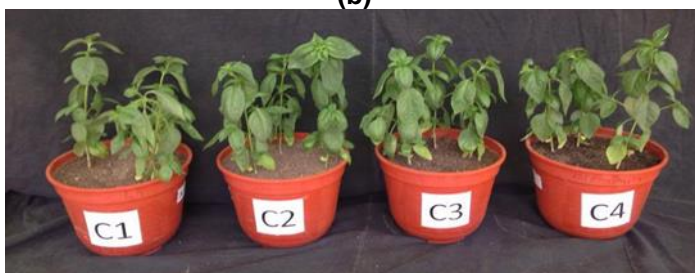
Figura 9 – Comparação visual entre plantas de diferentes modalidades de contaminação por NaCl à data da primeira colheita 18 dias após transplantação, a), e 28 dias após transplantação, b).



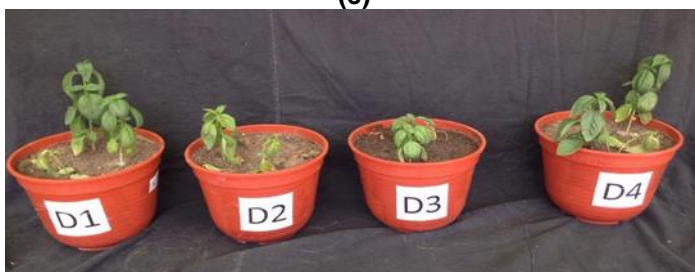
(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 10 – Plantas de manjerição após crescimento em meios com salinidade, 32 dias após transplantação: a) controlo, b) tratamento de $2,8 \text{ dS.m}^{-1}$, c) tratamento de $4,6 \text{ dS.m}^{-1}$, d) tratamento de $8,3 \text{ dS.m}^{-1}$, e) tratamento de $13,4 \text{ dS.m}^{-1}$.



Figura 11 – Sinais de clorose nas folhas de manjerição. Tratamento de $8,3 \text{ dS.m}^{-1}$, 8 dias após a transplantação.

Deve salientar-se que o crescimento das plantas na modalidade de tratamento superior ($13,4 \text{ dS.m}^{-1}$) revelou-se de todo inviável, já que a maior parte das plantas murchou durante as primeiras duas semanas após a transplantação, com sinais evidentes de murchidão logo nos dois primeiros dias de ensaio devido a efeitos de toxicidade iónica. Isto impossibilitou a recolha de material vegetal para amostra em muitos dos parâmetros analisados ao longo do trabalho.

CONCLUSÕES INTERCALARES:

A salinidade teve um efeito visível sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas, tendo-se observado menor crescimento das plantas em tratamentos de maior salinidade, devido a efeitos osmóticos e iónicos. O tratamento de $13,4 \text{ dS.m}^{-1}$ provocou a murchidão muito precoce da maior parte das plantas, inviabilizando definitivamente a cultura do manjerição em solo com estes níveis de condutividade elétrica.

4.3 Efeitos do stresse salino nos parâmetros de crescimento das plantas

4.3.1 Biomassa

O efeito da salinidade sobre a biomassa (peso fresco) das plantas foi avaliado em função da massa das folhas, dos caules e da massa total das plantas (exceto raízes), para as duas datas de colheita, intermédia (CInt) e final (CFin). A massa das raízes também foi avaliada, mas apenas para a CFin, já que a pesagem das raízes foi impossibilitada pela reduzida dimensão e massa das raízes à data da CInt.

A comparação dos resultados entre as datas de colheita não foi realizada, já que: (a) após a colheita intermédia o número de plantas foi reduzido, diminuindo a competição por nutrientes no vaso; (b) após a colheita intermédia foi aplicada a fertilização de cobertura, favorecendo o crescimento das restantes plantas em relação às removidas.

Observaram-se efeitos significativos ($p < 0,05$) da salinidade sobre a massa total das plantas, a massa das folhas, a massa dos caules e a massa das raízes (Figura 12).

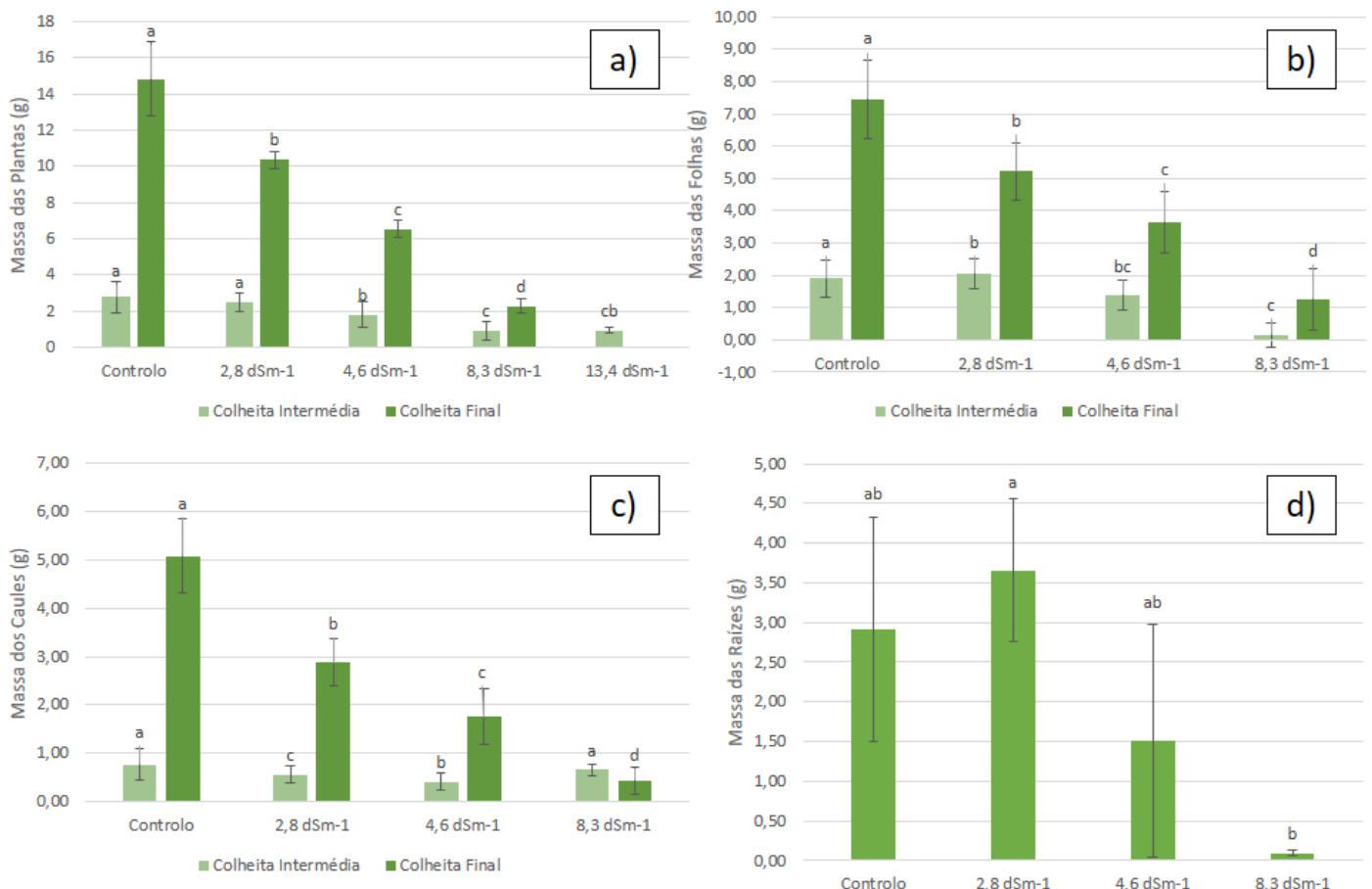


Figura 12 – Biomassa de plantas de manjeriço sujeitas a diferentes níveis de salinidade: a) massa total das plantas (exceto raiz); b) massa das folhas; c) massa dos caules; d) massa das raízes. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados em cada colheita para diferentes modalidades ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão.

Estes efeitos da salinidade sobre a biomassa fresca da planta foram observados por vários autores: Bione (2014), Fatemi & Aboutalebi (2013), Heidari (2011) e Montez (2014). De referir que em apenas um destes trabalhos o crescimento das plantas decorreu no solo - Fatemi & Aboutalebi (2013). Como já exposto e discutido no presente trabalho, a diminuição do crescimento das plantas em condições de stresse salino deve-se a efeitos osmóticos, que resultam na diminuição do potencial osmótico da planta e, assim, na sua capacidade de absorção de água e nutrientes, e/ou a efeitos tóxicos de iões específicos, que provocam a lesão de células nas folhas, reduzindo a taxa fotossintética e o crescimento.

Rhodes e Samaras (1994) descreveram que a inibição de crescimento sob condições osmóticas deve-se à redução de volume citoplasmático e à perda de turgescência celular.

A redução de produção de uma espécie vegetal sob condições de stresse salino em relação ao controlo constitui um indicador da sua tolerância às condições salinas. Katerji *et al.* (2000) referem que em culturas tolerantes como a beterraba ou o trigo duro esta redução será menor, enquanto que em culturas sensíveis como o tomate e o milho será mais elevada.

Comparando os resultados obtidos neste trabalho para a massa fresca das folhas de manjeriço (principal produto para utilização da planta) para a colheita final com o trabalho de Katerji *et al.* (2000), é possível classificar o manjeriço como uma cultura sensível à presença de NaCl (Figura 13).

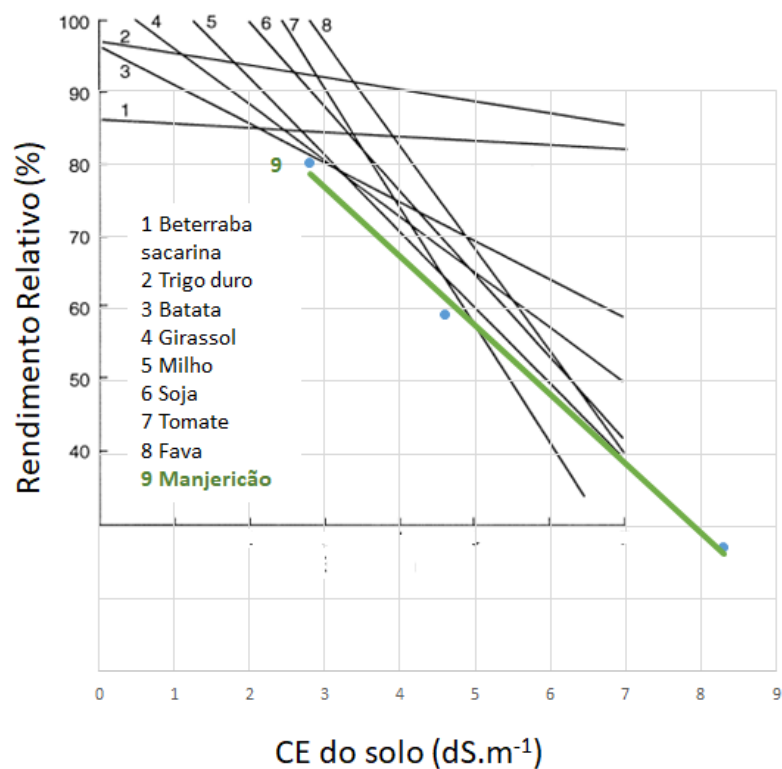


Figura 13 – Rendimento relativo de várias culturas em função da condutividade do solo (adaptado de Katerji *et al.*, 2000), incluindo a curva para o manjeriço. As retas desenhadas são resultado da regressão, sem incluir a condutividade elétrica correspondente ao controlo (0,8 dS.m⁻¹; 1,5 dS.m⁻¹ para o manjeriço).

4.3.2 Número de folhas

Avaliou-se o efeito da salinidade no número de folhas das plantas por contagem na colheita intermédia e final, tendo-se registado um efeito significativo ($p < 0,05$) da salinidade sobre o número de folhas das plantas. As plantas expostas aos tratamentos mais salinos apresentaram menos folhas (Figura 14).

A redução do número de folhas em condições salinas é um efeito conhecido do stresse salino (Raoul *et al.*, 2003; Jamil *et al.*, 2005; Qados, 2011; Munns, 2002).

Munns (2002), argumenta que este fenómeno se deve à acumulação de NaCl na parede celular e citoplasma das células de folhas mais velhas, causando a senescência prematura, associada ao efeito tóxico dos iões Cl^- e Na^+ . Tal acontece em plantas sensíveis à salinidade e provoca a queda das folhas. Contudo, não se tendo observado abscisão de folhas nas modalidades de 2,8 e 4,6 dS.m^{-1} , considera-se que o efeito osmótico sobre o crescimento das plantas foi o efeito determinante para estes resultados.

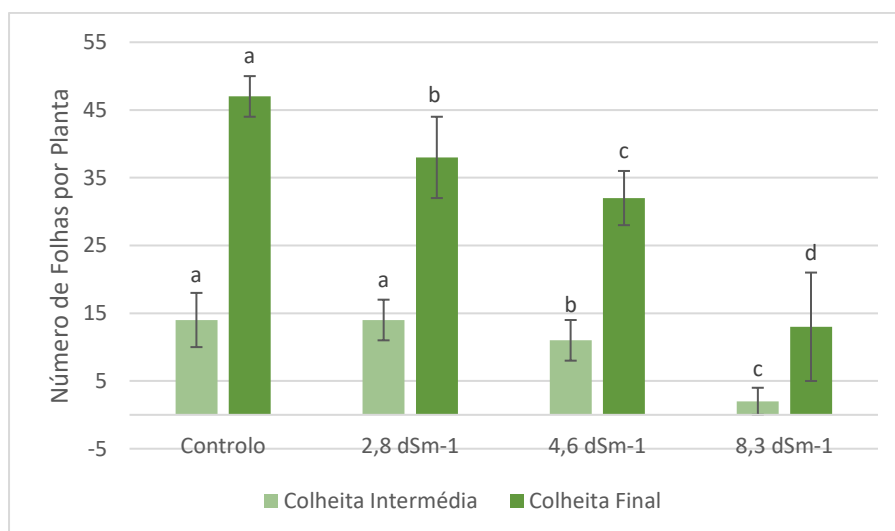


Figura 14 – Número de folhas por planta de plantas de manjerição sujeitas a diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados ($p < 0,05$) em cada colheita para diferentes modalidades. As barras representam o desvio padrão.

4.3.3 Comprimento entrenós e altura do caule

Os resultados obtidos indicam um efeito significativo da salinidade ($p < 0,05$) sobre o comprimento entre nós das plantas, em todos os entrenós analisados na CInt e CFin (exceto para o 6º nó) e na altura total do caule (Figuras 15, 16 e 17).

A redução do comprimento entrenós é também um efeito reportado por vários autores em culturas sob stresse salino (Wang *et al.*, 1997; Alizadeh *et al.*, 2011). A diminuição da altura da planta em condições salinas, já retratada em 4.2, pode estar relacionada com uma redução da expansão celular e crescimento da planta associados à baixa pressão de turgescência e à redução da capacidade de síntese de compostos orgânicos, devido à diminuição da taxa fotossintética, associando-se por isso aos efeitos osmóticos deste stresse. A salinidade também pode afetar a divisão celular (Volkmar *et al.*, 1998; Munns & Tester, 2008).

O crescimento da planta é o resultado da divisão e expansão das células que derivam do meristema localizado, composto por células semelhantes às dos caules que são as precursoras de todos os tipos de células diferenciados. Sacks & Silk (1997) demonstraram que o stresse hídrico causa o alongamento das células merismáticas e reduz a taxa de divisão celular, o que resulta na redução de dimensões do meristema e no menor crescimento da planta.

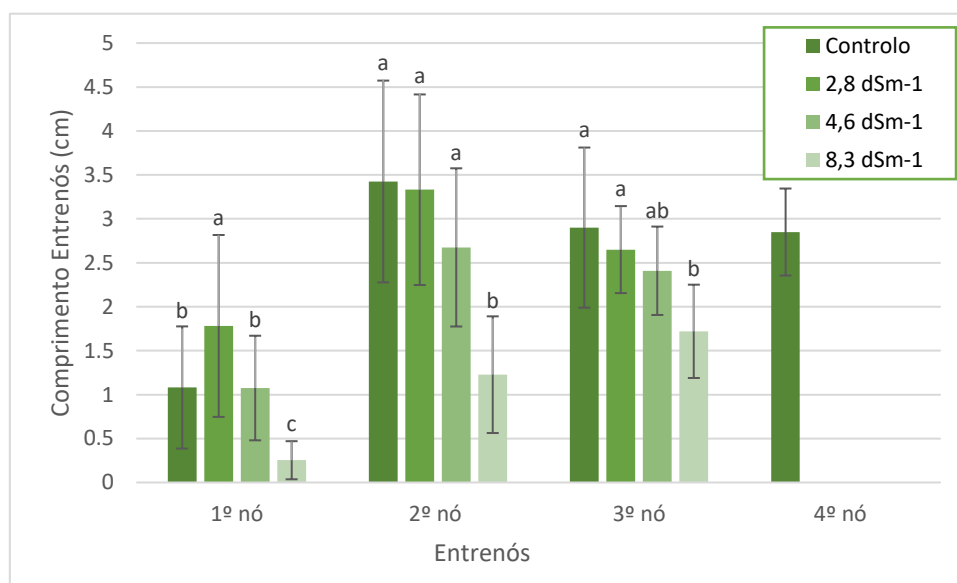


Figura 15 – Comprimento entrenós de plantas de manjeriço sujeitas a diferentes níveis de salinidade (Colheita Intermédia). As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados ($p < 0,05$) em cada colheita para diferentes modalidades. As barras representam o desvio padrão.

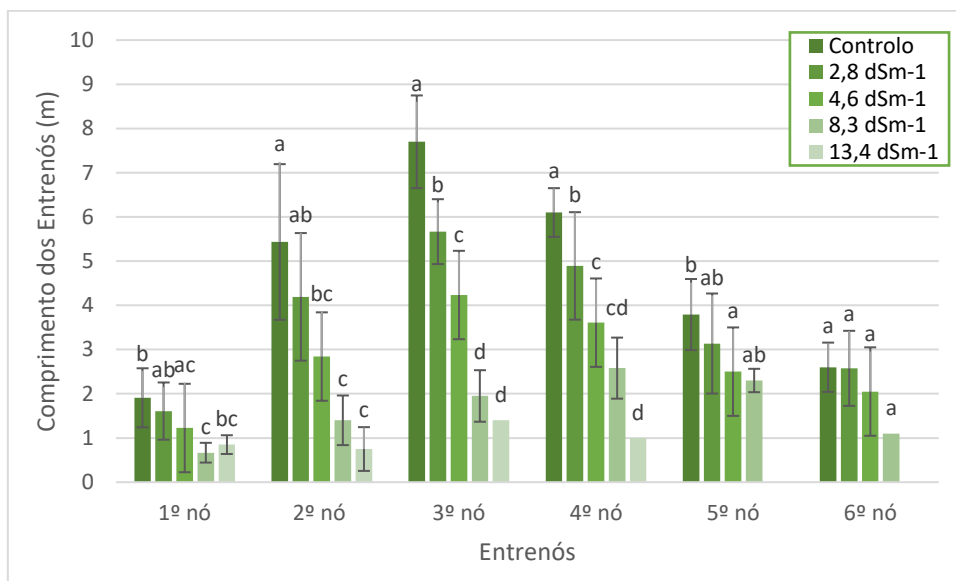


Figura 16 – Comprimento entrenós de plantas de manjeriço sujeitas a diferentes níveis de salinidade (Colheita Final). As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados ($p < 0,05$) em cada colheita para diferentes modalidades. As barras representam o desvio padrão.

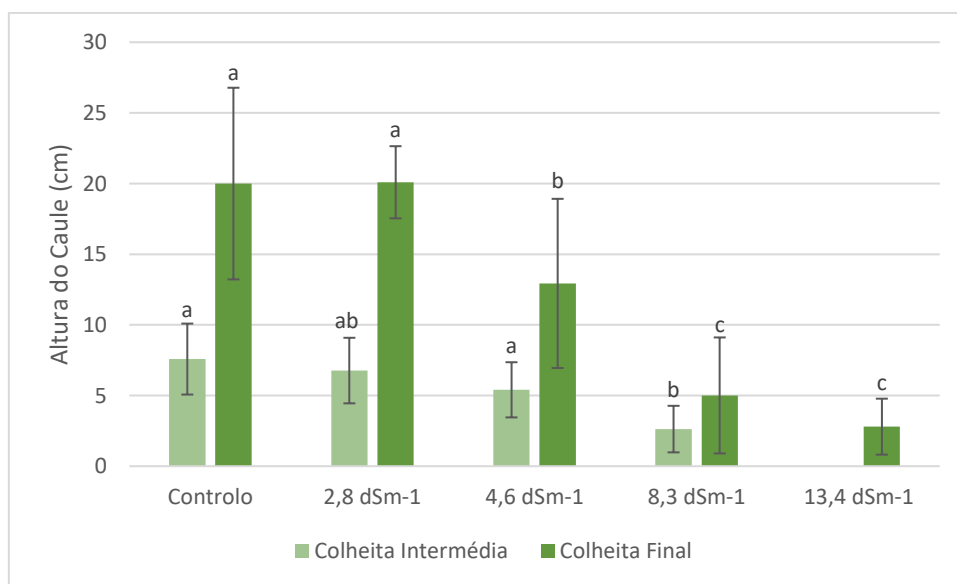


Figura 17 – Altura dos caules de plantas de manjeriço sujeitas a diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados ($p < 0,05$) em cada colheita para diferentes modalidades. As barras representam o desvio padrão.

CONCLUSÕES INTERCALARES:

A salinidade teve um efeito significativo sobre a biomassa fresca das plantas, nas folhas, caules e raízes, resultando na sua diminuição para níveis crescentes de CE, tanto na colheita intermédia como na final. Os resultados permitem classificar o manjerição como uma cultura sensível à salinidade.

A salinidade teve um efeito negativo significativo sobre o número de folhas por planta, tendo-se verificado uma diminuição para as plantas em meios de salinidade mais elevada.

A salinidade teve um efeito negativo significativo sobre o comprimento dos entrenós e consequente altura da planta para condições de salinidade crescente. Há uma concordância no efeito causado pela salinidade nestes parâmetros de crescimento estudados, indicando que há efectivamente processos fisiológicos e metabólicos que estão a ser afectados por estas condições, e que se manifestam em diferentes caraterísticas do crescimento das plantas.

4.4 Efeito do stresse salino na matéria seca

O efeito da salinidade sobre a massa seca (em percentagem da massa total) foi avaliado para as folhas, caules e raízes. O teor de massa seca dos tecidos pode ser um indicador da capacidade de absorção de água pelas plantas e serve como uma forma de avaliar a estratégia das plantas para a aquisição e uso de recursos (Duru *et al.*, 2009).

Observou-se uma influência significativa ($p < 0,05$) do fator em estudo na massa seca das folhas, tanto para a CInt como para a CFin, mas não na massa seca de caules e raízes, para o intervalo de CE considerado, observando-se também diferenças significativas para o teor de massa seca entre as duas datas de colheita em todas as modalidades, para todos os parâmetros (Figuras 18, 19 e 20). Para as folhas, o teor de massa seca diminuiu com a salinidade, o que está de acordo com os resultados em Fatemi & Aboutalebi (2013) e Bione (2014), trabalhos que reportam a redução da massa seca de plantas de manjerição quando expostas a semelhante stresse.

Os resultados indicam que pode existir uma diferença na absorção de água em condições salinas entre as folhas e os caules e raízes. A distribuição da matéria seca na planta é resultado do balanço da assimilação de carbono, partição de fotoassimilados entre os órgãos e perdas via respiração, exsudação e mortalidade dos órgãos, sendo afetada pela disponibilidade de nutrientes na rizosfera e o seu fluxo para a raiz (McDonald *et al.*, 1996).

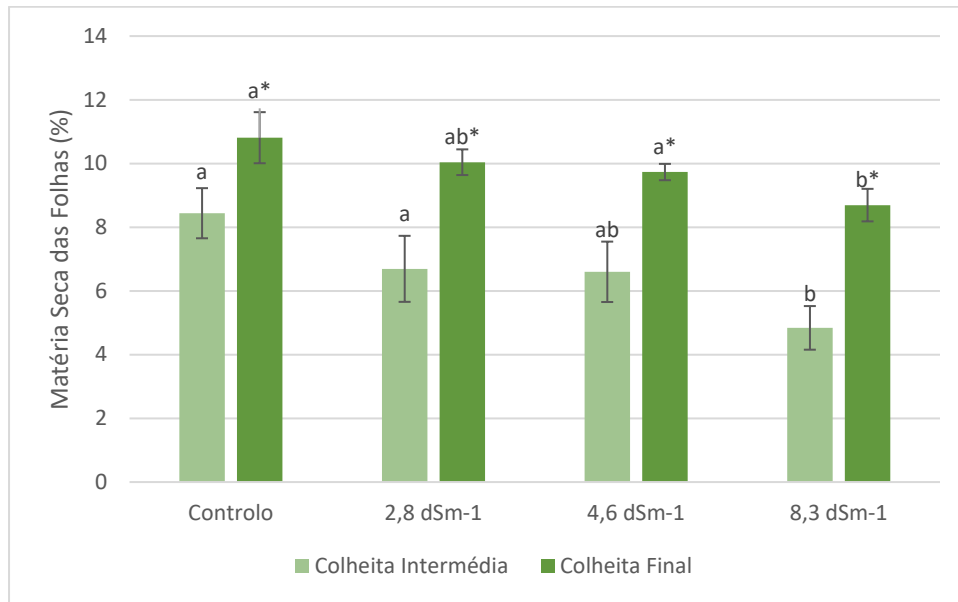


Figura 18 – Teor de massa seca de folhas de plantas de manjeriço sujeitas a diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados em cada colheita para diferentes modalidades ($p < 0,05$) e o símbolo (*) indica diferenças significativas entre as datas de colheita para a mesma modalidade. As barras representam o desvio padrão.

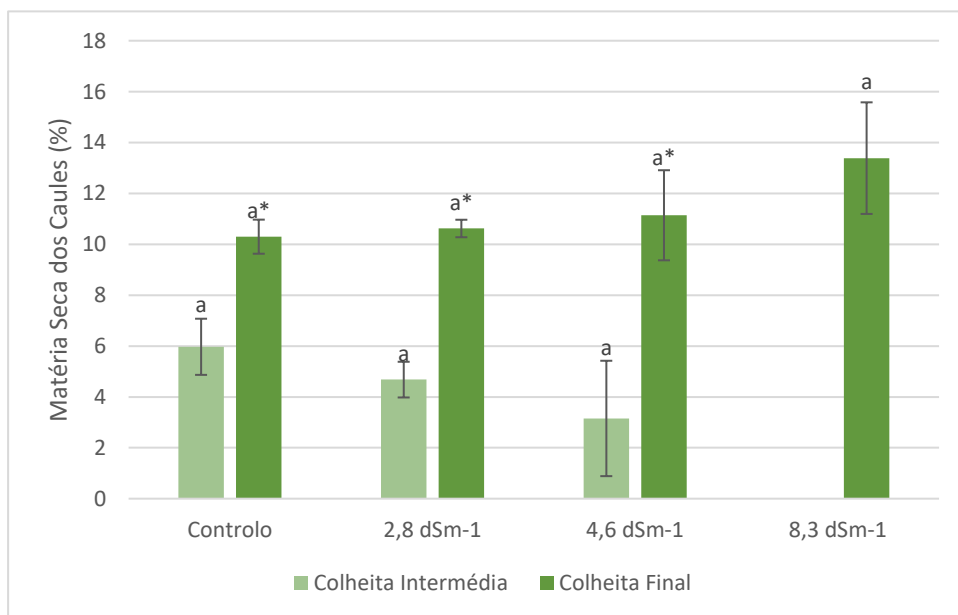


Figura 19 – Teor de massa seca de caules de plantas de manjeriço sujeitas a diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados em cada colheita para diferentes modalidades ($p < 0,05$) e o símbolo (*) indica diferenças significativas entre as datas de colheita para a mesma modalidade. As barras representam o desvio padrão.

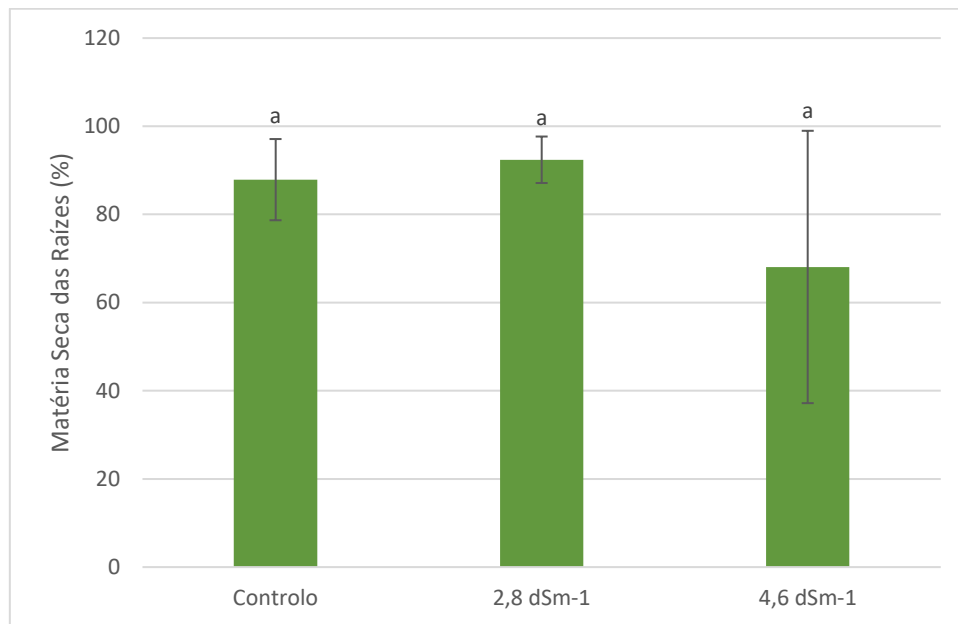


Figura 20 – Teor de massa seca de raízes de plantas de manjerição sujeitas a diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão.

A redução do teor de matéria seca nos tecidos de plantas expostos a stresse salino poderá estar associada a uma série de fatores devido a redução da taxa fotossintética e consequente menor produção de fotoassimilados. O teor de matéria seca aumentou significativamente na CFin, em relação à CInt, o que estará relacionado com a maior disponibilidade de nutrientes para as plantas que não foram retiradas na CInt.

CONCLUSÕES INTERCALARES:

A salinidade teve um efeito significativo sobre o teor de massa seca nas folhas, diminuindo-o, mas não sobre o teor de massa seca nos caules e nas raízes. As amostras da CFin apresentaram teores de matéria seca significativamente superiores aos da CInt.

4.5 Efeito do stresse salino no teor de clorofila das folhas

Observou-se um efeito significativo negativo ($p < 0,05$) da salinidade no teor de clorofila das folhas (Figura 21). Resultados idênticos foram reportados por Heidari (2011), que observou a diminuição do conteúdo em clorofila a e b em folhas de manjerição ao aumentar a CE da solução nutritiva para 6 dS.m⁻¹ em relação ao controlo.

Utilizando as mesmas plantas de manjeriço e o mesmo sistema de medição *Hansatech*, para plantas desenvolvidas em solução nutritiva, Montez (2014), registou o aumento do teor de clorofila para a modalidade de tratamento com adição de 25 mM de NaCl em relação ao controlo. No entanto, estes resultados não estão em contradição, dado que a concentração salina utilizada por Montez (2014) foi relativamente baixa comparada com as duas primeiras modalidades de tratamento deste trabalho (2,8 e 4,6 dS.m⁻¹) e nesta gama de salinidade as diferenças estatísticas obtidas foram diminutas e mesmo inexistentes, respetivamente.

A perda de clorofila sob stresse salino pode ser explicada pela diminuição da taxa fotossintética ou por aumento da produção de ROS, tal como exposto em 2.2.3.

Verificou-se um aumento significativo do teor de clorofila, para a mesma modalidade, entre as datas de colheita (excepto para a modalidade de 8,3 dS.m⁻¹), o que estará associado a uma maior disponibilidade de nutrientes pelas razões já referidas.

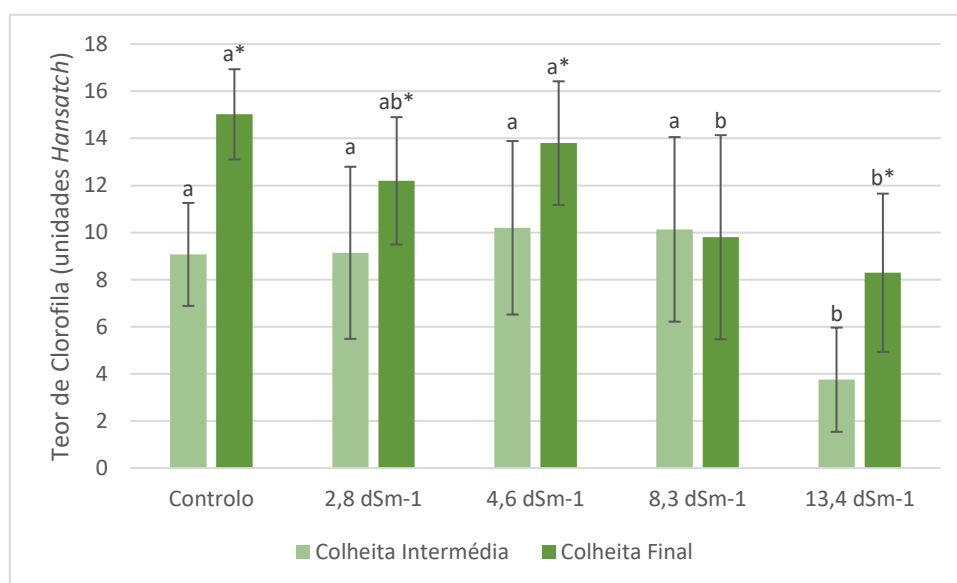


Figura 21 – Teor em clorofila de caules de plantas de manjeriço sujeitas a diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados em cada colheita para diferentes modalidades ($p < 0,05$) e o símbolo (*) indica diferenças significativas entre as datas de colheita para a mesma modalidade. As barras representam o desvio padrão.

CONCLUSÕES INTERCALARES:

A salinidade teve um efeito negativo significativo sobre o teor de clorofila das folhas, que se torna mais evidente para a segunda data de colheita. Verificou-se a redução do teor de clorofila para a modalidade de 13,4 dS.m⁻¹ na Cint e para as modalidades de 8,3 e 13,4 dS.m⁻¹ na CFin.

4.6 Efeito do stresse salino no conteúdo mineral dos órgãos vegetais

Em relação ao conteúdo mineral das folhas, caules e raízes, observou-se um efeito significativo ($p < 0,05$) da salinidade para quase todos os casos estudados (exceções: Ca em caules da CFin; Fe em folhas da CInt; Mg em caules da CFin). Estes resultados encontram-se nas Figuras 22 e 23. Destes resultados se infere que o stresse salino tem um importante papel na acumulação de elementos minerais do manjerição. A tendência geral verificada foi a de aumento do teor de elementos minerais nestes órgãos para as modalidades com maior condutividade elétrica.

Para níveis de salinidade crescentes, os teores de Na subiram em maior grau que os de K, o que reduziu a relação K^+/Na^+ na membrana celular, mas tal não provocou a diminuição dos teores de Ca referida na literatura para plantas sensíveis à salinidade, possivelmente devido ao efeito da adubação fosfatada (Mengel & Kirby, 2001; Rubio *et al.*, 2003; Cuartero & Muñoz, 1999; Chow *et al.*, 1990), como observado na Figura 24.

Esta tendência geral de acumulação de minerais estará associada à menor biomassa das plantas cujos ensaios decorreram em solos mais contaminados, pelo que para igual ou semelhante grau de acumulação de minerais para as várias modalidades se obteve concentrações diferentes dos elementos nos tecidos. De facto, por análise das Figuras 22 e 23 é perceptível que é nas duas modalidades de maior CE do solo que se verificam exclusivamente concentrações dos elementos que geram diferenças estatísticas significativas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caraterização do stresse salino em plantas de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.)

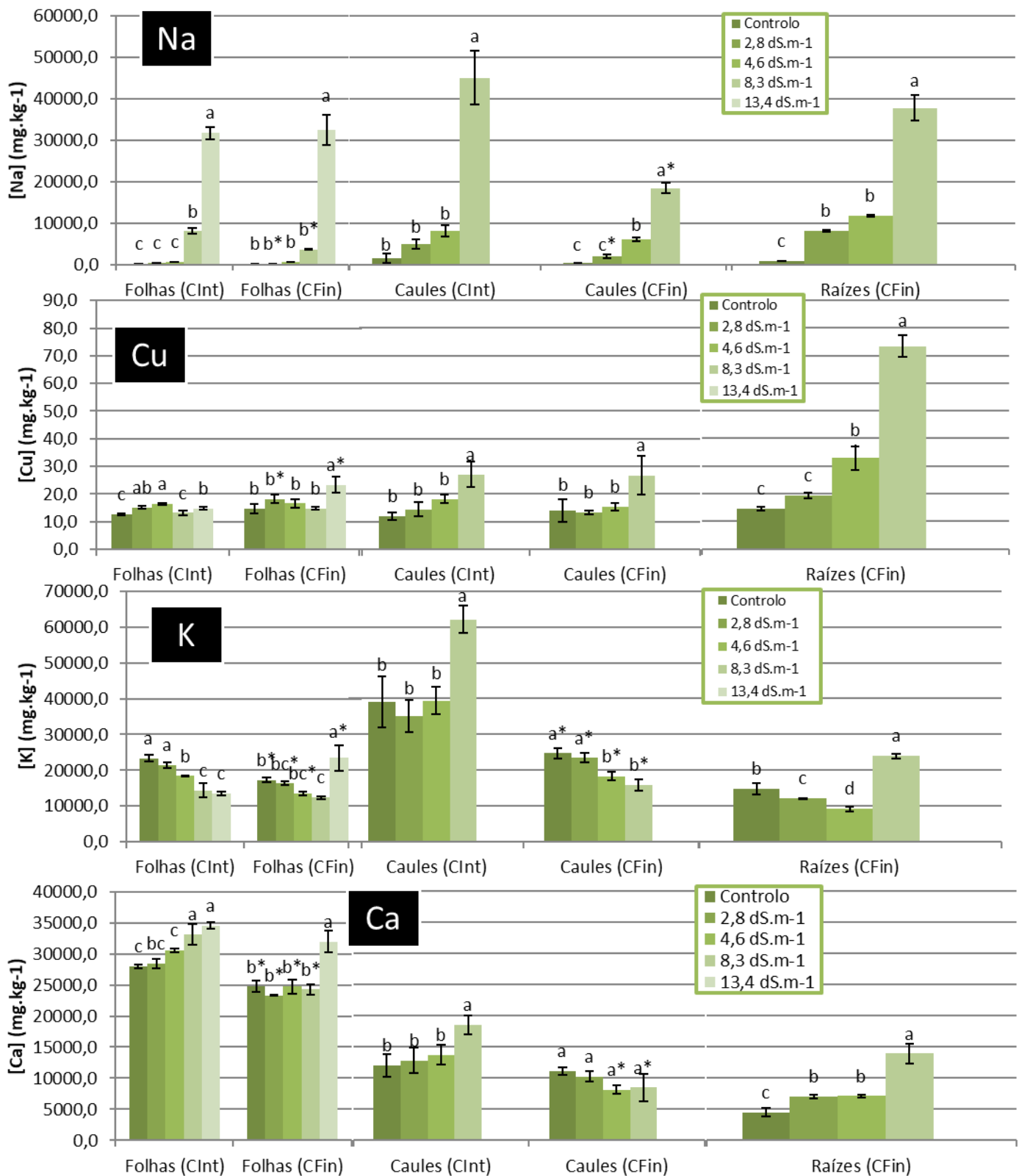


Figura 22 – Concentração de elementos minerais em folhas, caules e raízes de plantas de manjeriço sujeitas a diferentes níveis de salinidade (Na, Cu, Ca e K). As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados em cada colheita para diferentes modalidades ($p < 0,05$) e o símbolo (*) indica diferenças significativas entre as datas de colheita para a mesma modalidade. As barras representam o desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caraterização do stresse salino em plantas de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.)

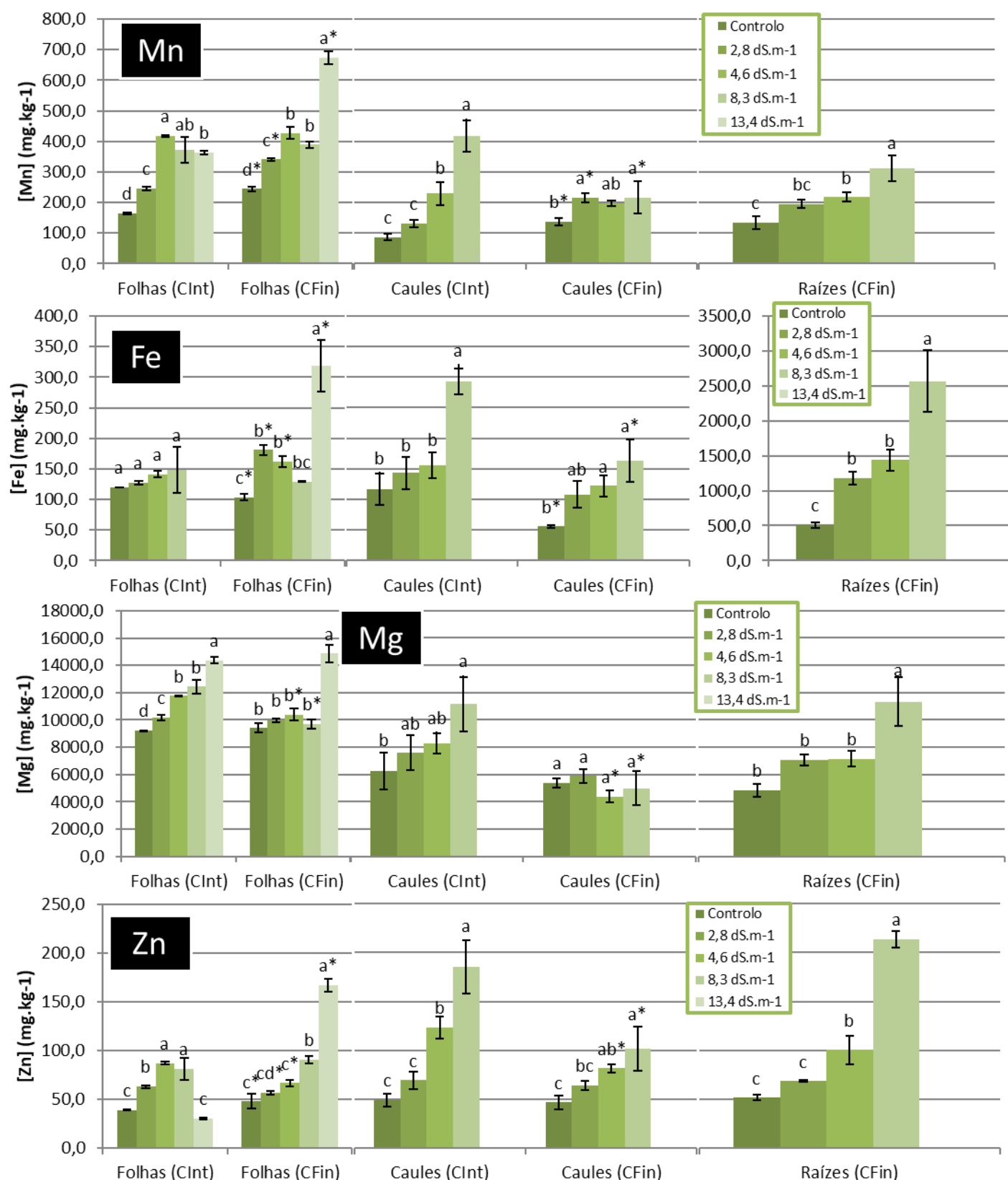


Figura 23 – Concentração de elementos minerais em folhas, caules e raízes de plantas de manjeriço sujeitas a diferentes níveis de salinidade (Mn, Fe, Zn e Mg). As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados em cada colheita para diferentes modalidades ($p < 0,05$) e o símbolo (*) indica diferenças significativas entre as datas de colheita para a mesma modalidade. As barras representam o desvio padrão.

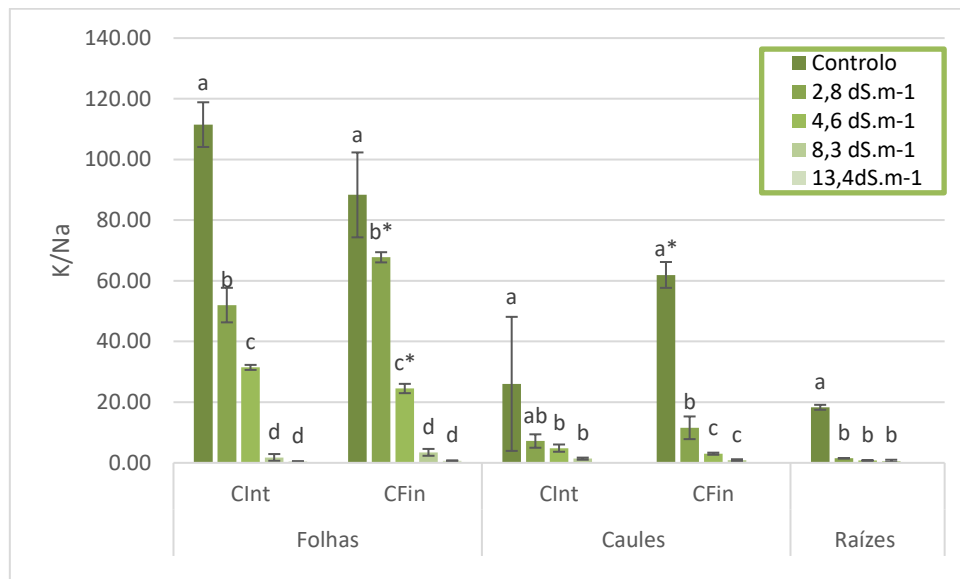


Figura 24 – Relação K/Na nos tecidos de plantas de manjeriço sujeitas a diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados em cada colheita para diferentes modalidades ($p < 0,05$) e o símbolo (*) indica diferenças significativas entre as datas de colheita para a mesma modalidade. As barras representam o desvio padrão.

A acumulação de Mg e Mn nos tecidos das plantas em condições salinas aparenta variar grandemente consoante a cultura, sendo que este stresse pode induzir efeitos positivos ou negativos na sua acumulação (Grattan & Grieve, 1998). Verificou-se que a salinidade teve um efeito positivo sobre as concentrações destes dois elementos nos órgãos vegetais, ao contrário do que foi observado por Montez (2014). Não foi, aliás, a única contradição com este trabalho anterior, já que apenas o aumento significativo dos teores de K aqui registados - que já tinha sido observado por Fatemi & Aboutalebi (2013) - coincide com este trabalho. Estas diferenças dever-se-ão, para além do que foi referido no parágrafo anterior, ao delineamento experimental. Montez (2014) preparou o ensaio sob cultivo hidropónico, o que resultou em interações entre os nutrientes bastante variáveis em relação às que se estabelecem no solo. A diferença fundamental entre estes trabalhos pode estar nas maiores concentrações de NaCl utilizadas para a contaminação dos solos no presente estudo.

A concentração de Fe muito superior nas raízes em relação a caules e folhas sugere dificuldades na translocação deste nutriente na planta agudizadas pela salinidade, já que, embora a concentração de Fe já seja superior nas raízes no controlo, esta diferença aumenta para os ensaios de salinidade crescente. De qualquer modo, o teor de Fe também aumentou nos caules e folhas da planta com a CE, pelo que a salinidade não terá causado carência de Fe. O Fe nas plantas está associado à síntese de clorofila, pelo que se procedeu à análise da correlação linear entre o teor de Fe nas folhas e o teor de clorofila para ambas as datas de colheita.

Os resultados obtidos para o coeficiente de correlação de Pearson (0,5471 para a CInt e -0,6128 para a CFin) não demonstraram influência da salinidade sobre a relação Fe/clorofila.

O Zn aparenta ter um efeito protetor em condições salinas, devido ao seu papel na manutenção da integridade estrutural da membrana plasmática, controlando assim a absorção de Na e outros elementos tóxicos (Cakmak, 2006; Tavallali *et al.*, 2009). Assim, o aumento significativo dos teores de zinco e magnésio verificado nos órgãos do manjerição com o aumento da salinidade do solo pode revelar uma estratégia por parte da planta para reduzir os efeitos nocivos da salinidade.

Os resultados indicam que, de modo geral, o crescimento das plantas em meio salino tem um efeito significativamente positivo sobre o teor de zinco nos tecidos.

CONCLUSÕES INTERCALARES:

A salinidade teve um efeito significativo positivo geral sobre a concentração dos elementos analisados (Na, Cu, Ca, K, Mn, Fe, Zn, Mg) nos órgãos da planta. A salinidade provocou a diminuição da relação K/Na, mas tal não se traduziu na diminuição da acumulação de Ca. O elemento Fe foi acumulado em muito maior grau nas raízes do que nos caules e folhas. O aumento dos teores de Zn, Mg e Cu podem estar associados a mecanismos de defesa da planta contra os danos causados pelo stresse salino, mas a tendência geral de aumento de concentração de todos os elementos com a salinidade dever-se-à principalmente à menor biomassa das plantas em solos mais contaminados.

4.7 Efeitos do stresse salino nos parâmetros indicativos de stresse oxidativo**4.7.1 Peróxido de hidrogénio (H₂O₂)**

A concentração de H₂O₂ nas folhas das plantas de manjerição do ensaio foi avaliada, não se tendo verificado efeito significativo ($p < 0,05$) da salinidade sobre este parâmetro, embora para as modalidades de 4,6 e 8,3 dS.m⁻¹ se tenha observado um aumento da concentração de peróxidos, ainda que não significativo (Figura 25).

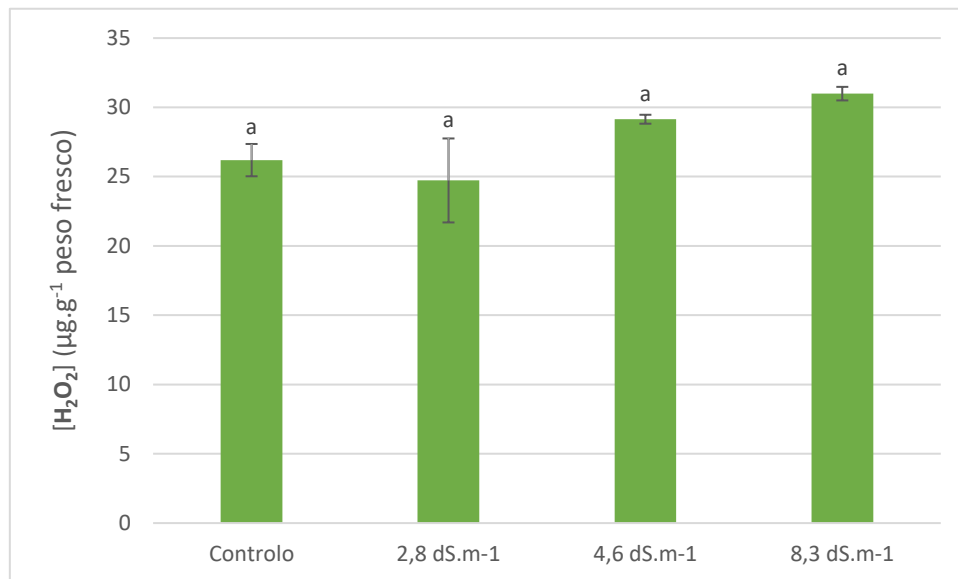


Figura 25 – Concentração de H₂O₂ em folhas de plantas de manjerição sujeitas a diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados para cada modalidade, em relação à colheita final. As barras representam o desvio padrão.

O aumento dos níveis de peróxido de hidrogénio em plantas sob stresse salino é um fenómeno reportado por diversos autores (Leitão, 2014; Kong-ngern *et al.*, 2012; Xiong & Zhu, 2002).

Estes resultados encontram paralelo no trabalho de Tarchoune *et al.* (2010), que em estudo com esta planta, não observaram um efeito singnificativo dos níveis de H₂O₂ após tratamento com 50 mM de NaCl, associando este facto à indução da ascorbato-peroxidase (APX) verificada, enzima responsável pela catálise da redução de H₂O₂. Tarchoune *et al.* (2012), voltam a não identificar diferenças significativas nos teores de H₂O₂ de manjerição contaminado com 50 mm de NaCl nos primeiros 15 dias de tratamento, observando um aumento significativo de peróxidos para o tratamento de 30 dias, coincidente com um aumento da atividade da APX. Combinados, os resultados destes trabalhos apontam para uma capacidade do manjerição em minimizar a produção de ROS e, concretamente, de peróxidos, em condições salinas, pelo menos até um certo nível.

4.7.2 Malondialdeído (MDA)

Não se observou um efeito significativo ($p < 0,05$) da salinidade do solo sobre os teores de MDA das folhas (Figura 26).

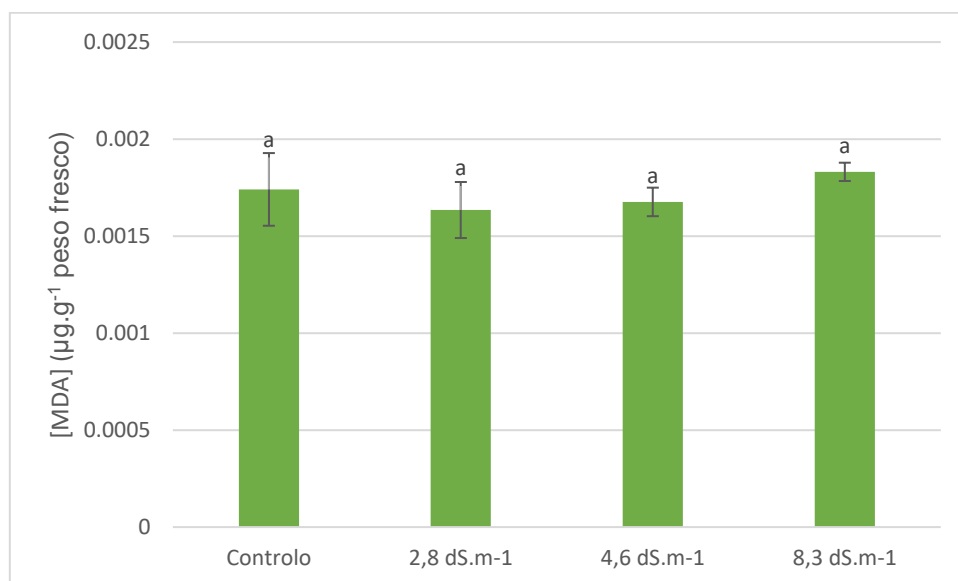


Figura 26 – Concentração de MDA em folhas de plantas de manjerição sujeitas a diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados para cada modalidade, em relação à colheita final. As barras representam o desvio padrão.

Dado que o MDA é produto da peroxidação lipídica, estes resultados são congruentes com os do ponto anterior (4.7.1) e contribuem para a hipótese apresentada anteriormente de que o manjerição possui alguma capacidade de regulação dos níveis de ROS nos seus tecidos, temática explorada em maior detalhe nos trabalhos já referidos de Tarchoune *et al.* (2010 e 2012). Tal não surge como supresa, já que o óleo essencial de manjerição tem propriedades antioxidantes conhecidas (Simon *et al.*, 1999). Dabire *et al.* (2012), demonstraram que este óleo oferece uma boa possibilidade no controlo da peroxidação lipídica de óleo de semente de algodão, enquanto que Pandey *et al.* (2016) relataram o aumento da tolerância ao stresse salino de plantas de arroz quando adicionado à solução de crescimento extrato de folhas de *Ocimum sanctum*, planta do género.

Por outro lado, Delavari *et al.* (2014), observaram o aumento significativo do teor de MDA em raízes de manjerição sujeitas a stresse salino.

CONCLUSÕES INTERCALARES:

A salinidade não teve um efeito significativo sobre o teor de H₂O₂ nas folhas da planta nem sobre o teor de MDA, o que sugere que a planta possui mecanismos regulatórios eficientes contra o stresse oxidativo em condições salinas. Não há evidências neste trabalho de sinais de aumento do stresse oxidativo com base nos indicadores estudados causado pelo crescimento das plantas em solos contaminados com NaCl.

4.8 Efeitos do stresse salino no conteúdo proteico e glucídico

4.8.1 Prolina livre

Em relação à prolina, aminoácido com conhecido carácter osmoprotetor, observou-se um efeito significativo ($p < 0,05$) da salinidade sobre o teor desta molécula nas folhas de manjeriço (Figura 27).

Estes resultados são congruentes com o observado por Heidari et al. (2011), que relataram aumentos significativos no teor de prolina livre em folhas de manjeriço expostas a salinidade superior a 6 dS.m⁻¹. Tais resultados sugerem que o manjeriço é capaz de aumentar os níveis de acumulação de prolina no citoplasma em condições de stresse salino, com a possível consequência inibidora dos níveis de ROS observada no ponto 4.7.

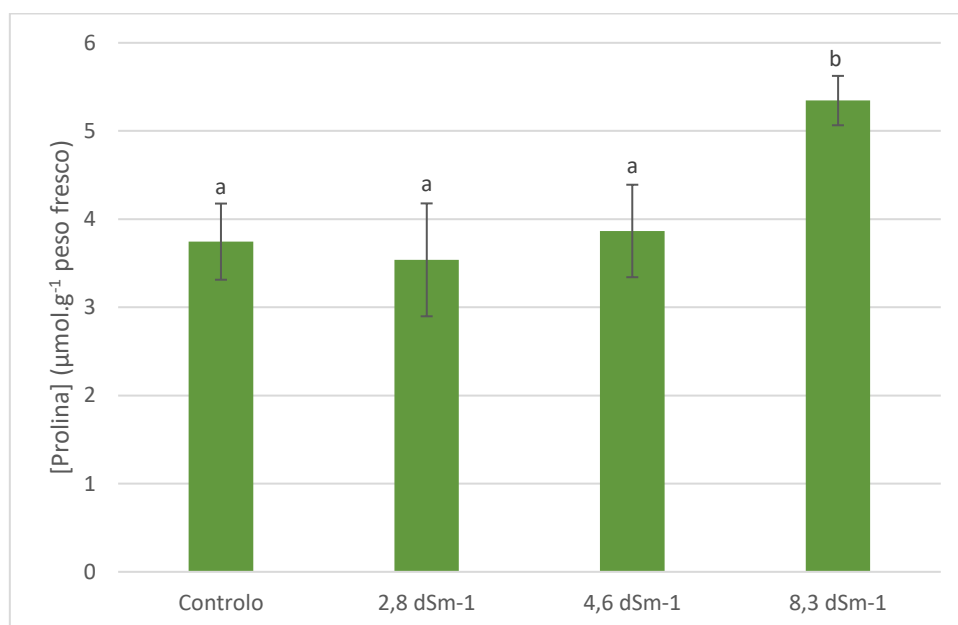


Figura 27 – Concentração de prolina livre em folhas de plantas de manjeriço sujeitas a diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados para cada modalidade, em relação à colheita final. As barras representam o desvio padrão.

4.8.2 Proteína solúvel

Observou-se um efeito significativo ($p < 0,05$) da salinidade sobre o teor de proteína solúvel nas folhas de manjeriço, sendo que o aumento da concentração de NaCl no solo traduziu-se no aumento deste parâmetro (Figura 28). De notar que não foi possível realizar o teste para a modalidade de 8,3 dS.m⁻¹, devido à falta de material foliar, consequência da menor biomassa das folhas obtida para esta modalidade.

Os resultados sugerem que o manjerição recorre ao aumento da produção de compostos azotados sob stresse salino. Não se encontrou na bibliografia outro trabalho incidente sobre este parâmetro em plantas de manjerição. Neto *et al.* (2009) registaram aumento do teor de proteína solúvel e compostos azotados solúveis em folhas e raízes de milho em duas variedades (uma tolerante e outra sensível ao stress salino), sendo esses aumentos superiores na variedade tolerante.

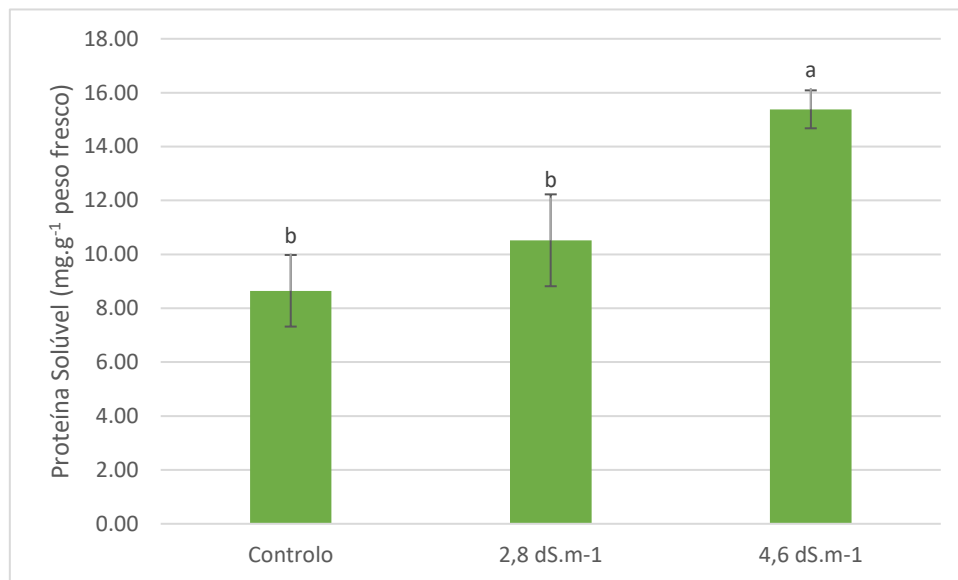


Figura 28 – Concentração de proteína solúvel em folhas de plantas de manjerição sujeitas a diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados para cada modalidade, em relação à colheita final. As barras representam o desvio padrão.

4.8.3 Açúcares solúveis

Não se observou um efeito significativo ($p < 0,05$) da salinidade do solo sobre o teor de açúcares solúveis nas folhas de manjerição, embora se tenha verificado um aumento deste parâmetro para as plantas em meios de maior salinidade (Figura 29).

Estes resultados encontram paralelo no trabalho de Heidari *et al.* (2011), que, de modo semelhante, não encontraram efeito significativo entre este parâmetro e a salinidade do meio de cultura, embora o teor de açúcares solúveis tenha sido superior ao controlo para CE de 3 e 6 dS.m⁻¹. Também para esta determinação não foi possível realizar o teste para a modalidade de 8,3 dS.m⁻¹, devido à falta de material foliar.

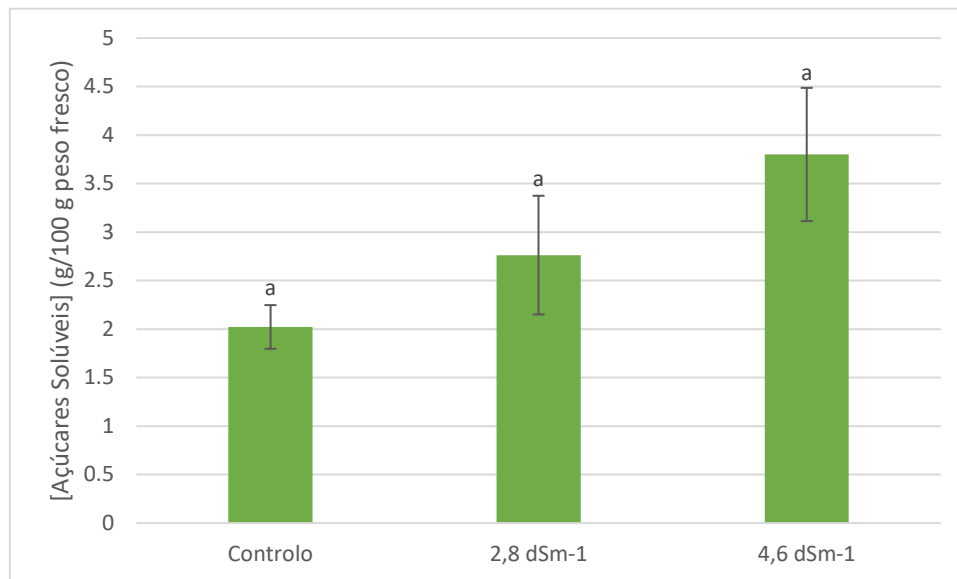


Figura 29 – Concentração de açúcares solúveis em folhas de plantas de manjeriço sujeitas a diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados para cada modalidade, em relação à colheita final. As barras representam o desvio padrão.

Em trabalho prévio, Delavari *et al.* (2014) observaram um aumento significativo dos teores de açúcares solúveis em raízes de manjeriço expostas a 100 mM NaCl. Não é de excluir no entanto que, devido às análises terem sido realizadas sobre órgãos diferentes, os resultados difiram, consequência da variabilidade de partição dos açúcares solúveis na planta.

CONCLUSÕES INTERCALARES:

A salinidade teve um efeito significativo sobre o teor de prolina livre nas folhas da planta, registando-se um aumento significativo deste para a modalidade de tratamento de 8,3 dS.m⁻¹.

A salinidade resultou num aumento significativo do teor de proteína solúvel nas folhas da planta, registando-se diferença significativa entre a modalidade de tratamento de 4.6 dS.m⁻¹ e o controlo.

A salinidade não teve um efeito significativo sobre o teor de açúcares solúveis nas plantas, o que poderia descartar a sua acumulação como um dos mecanismos de tolerância ao stresse salino no manjeriço, mas registou-se um aumento, ainda que não significativo, deste parâmetro, nas amostras dos tratamentos com NaCl em relação ao controlo.

No conjunto, estes resultados sugerem que o manjeriço é capaz de sintetizar osmólitos protetores em condições de stresse salino. O aumento verificado para os compostos com funções de regulação osmótica, por oposição aos compostos indicadores de stress oxidativo (4.7), sugere que o crescimento da planta sob condições de stresse salino por NaCl depende fundamentalmente do efeito osmótico, e não do stresse oxidativo.

4.9 Efeitos da salinidade nos minerais extraíveis do solo

4.9.1 Azoto extraível

Observou-se um efeito significativo da salinidade sobre o azoto nítrico extraível ($p < 0,05$), mas não para o azoto amoniacal extraível, no solo no final do ensaio (Figuras 30 e 31).

No caso do azoto amoniacal, observou-se uma tendência para o aumento da concentração de azoto no solo com o aumento da CE. Tal poderia ser explicado pelo menor crescimento das plantas sujeitas a condições de salinidade mais elevada. Estas plantas desenvolveram menos folhas e com menos massa, não sendo capaz de utilizar tão eficazmente o azoto no solo, devido a deficiente síntese de fotoassimilados. Contudo, a reduzida extração para o solo da modalidade de CE mais elevada contradiz esta hipótese. É possível que a extração dos elementos do solo tenha sido afetada pelo alto teor de NaCl.

A forma nítrica do azoto é a combinação azotada mais rapidamente utilizada pela quase totalidade das plantas. Seria de esperar gráficos semelhantes nas Figuras 30 e 31, em condições normais, o que não se verificou de todo neste trabalho, possivelmente devido à interferência da elevada concentração salina na atividade biológica das *Nitrosomonas spp.* e *Nitrosomonas spp.*, mediadoras do processo de nitrificação.

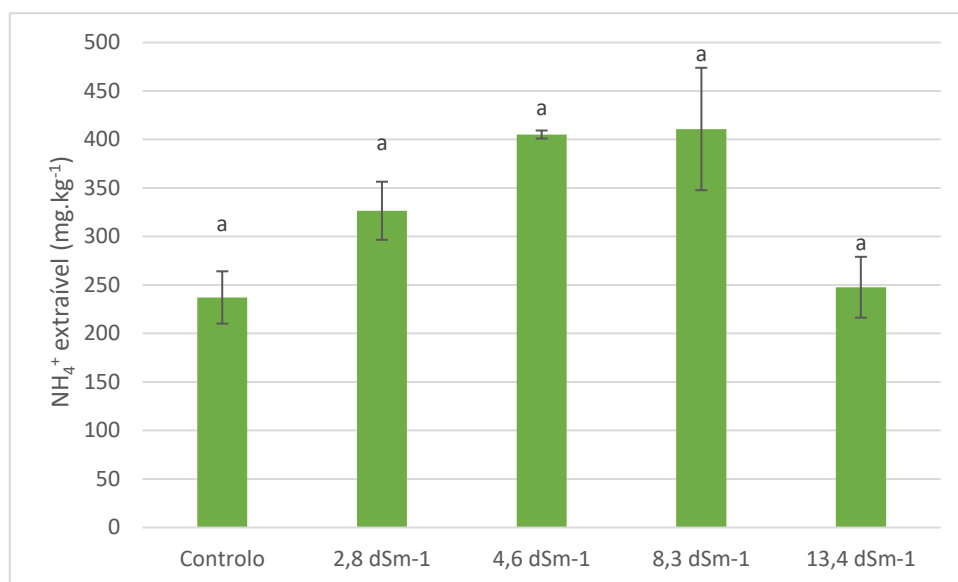


Figura 30 – Concentração de azoto amoniacal extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados para cada modalidade. As barras representam o desvio padrão.

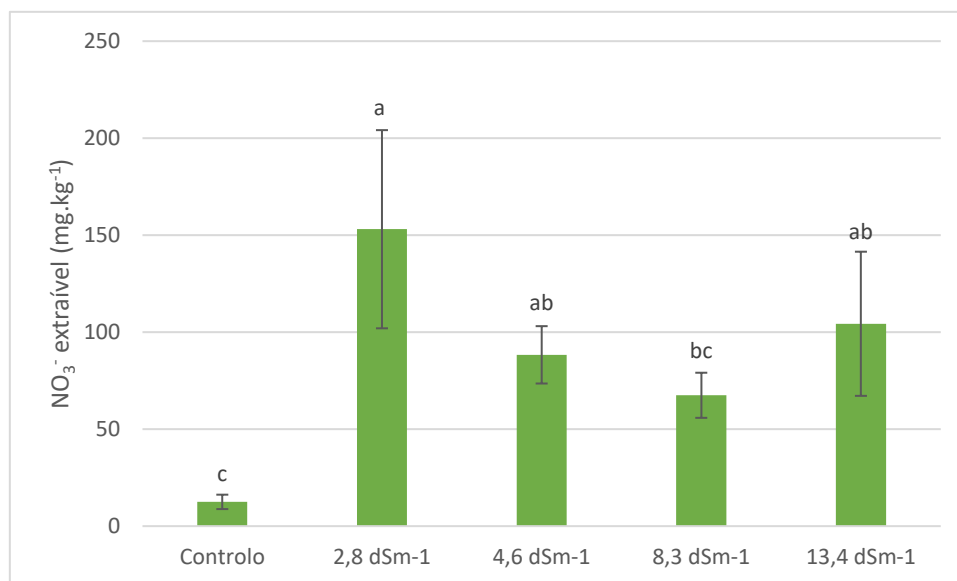


Figura 31 – Concentração de azoto nítrico extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados para cada modalidade. As barras representam o desvio padrão.

4.9.2 Fósforo e potássio extraíveis

Observou-se um efeito significativo da salinidade ($p < 0,05$) sobre os teores de P (Figura 32) e K extraíveis no solo (Figura 33).

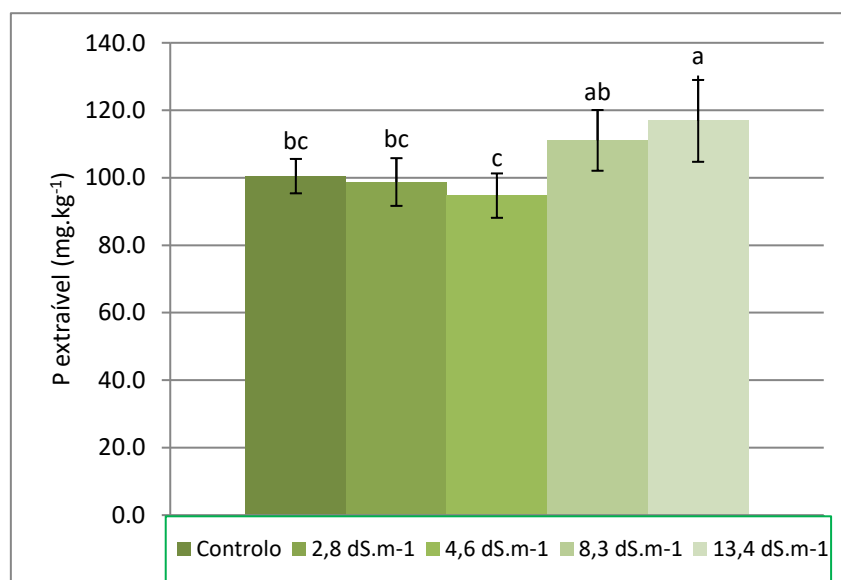


Figura 32 – Concentração de fósforo extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados para cada modalidade. As barras representam o desvio padrão.

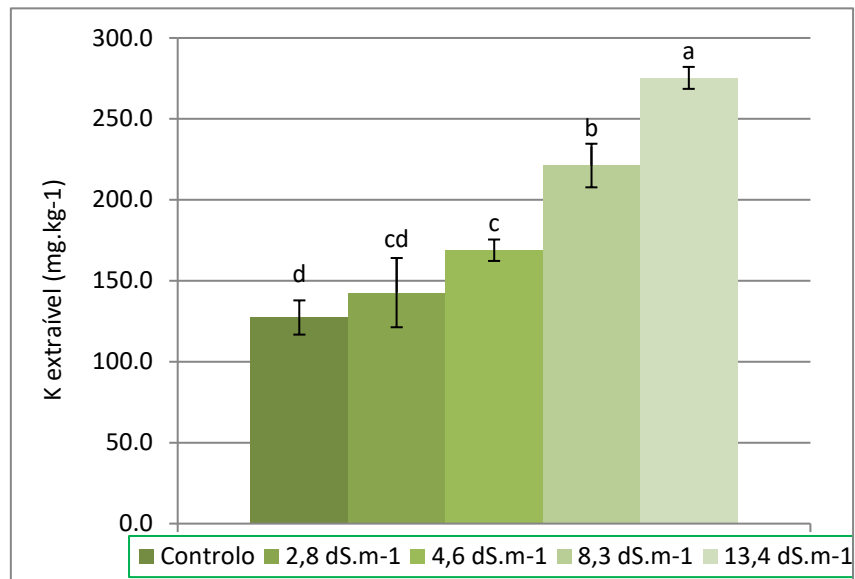


Figura 33 – Concentração de potássio extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados para cada modalidade. As barras representam o desvio padrão.

Em relação ao P, verificou-se que, apesar da modalidade de tratamento de 4,6 dS.m⁻¹ apresentar o mais baixo valor de nutriente extraível, as diferenças entre modalidades serão principalmente explicadas pelo menor crescimento das plantas (nas duas modalidades de tratamento com as maiores condutividades elétricas observou-se mais P extraível presente no solo). Assim se explicam também os resultados para o K extraível.

4.9.3 Macronutrientes extraíveis

Verificou-se um aumento significativo da salinidade sobre a concentração de Na extraível no solo ($p < 0,05$) mas não sobre a concentração de Ca extraível (Figuras 34 e 35).

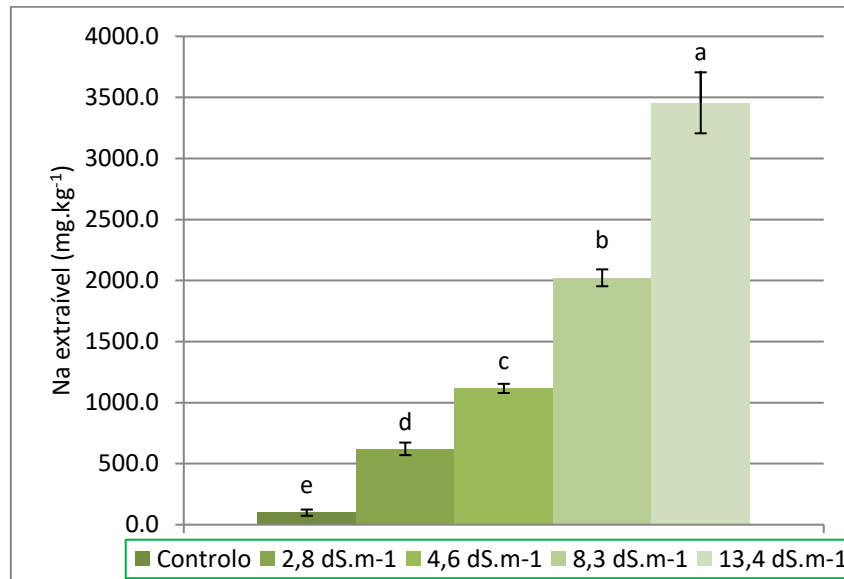


Figura 34 – Concentração de sódio extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados para cada modalidade. As barras representam o desvio padrão.

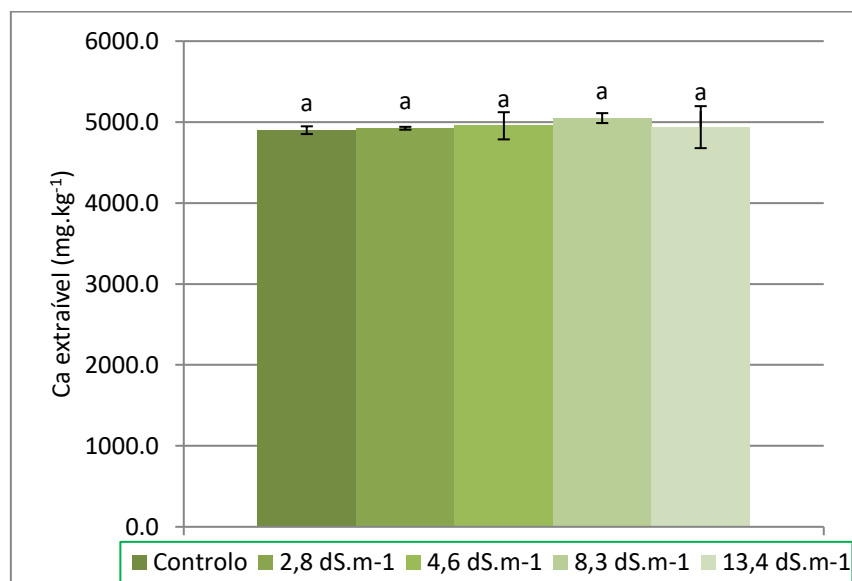


Figura 35 – Concentração de cálcio extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados para cada modalidade. As barras representam o desvio padrão.

Embora as plantas sujeitas a maiores CE no solo tenham absorvido mais Na (ponto 4.6), os resultados na Figura 34 acabam por traduzir o delineamento experimental, os solos contaminados com maior quantidade de NaCl adicionada acumularam Na em maior proporção, como seria de esperar.

4.9.4 Micronutrientes extraíveis

Observou-se um efeito significativo da salinidade ($p < 0,05$) sobre as concentrações de Zn e Mn no solo (Figuras 36 e 37), mas não sobre as concentrações de Cu, Fe e Mg (Figuras 38 a 40). Para o caso do Zn e do Mn, os solos com maior CE apresentaram maior extração mineral. Keshavarz *et al.* (2006) reportam aumentos e reduções da extração de Zn em solos calcários salinos recorrendo a diferentes soluções extrativas. A composição iónica da solução do solo, o seu pH e o método extrativo escolhido influenciam a extração deste elemento mineral. No caso do Zn a grande diferença entre as modalidades poderá estar associada a uma interferência da elevada CE na extração de este elemento dos solos.

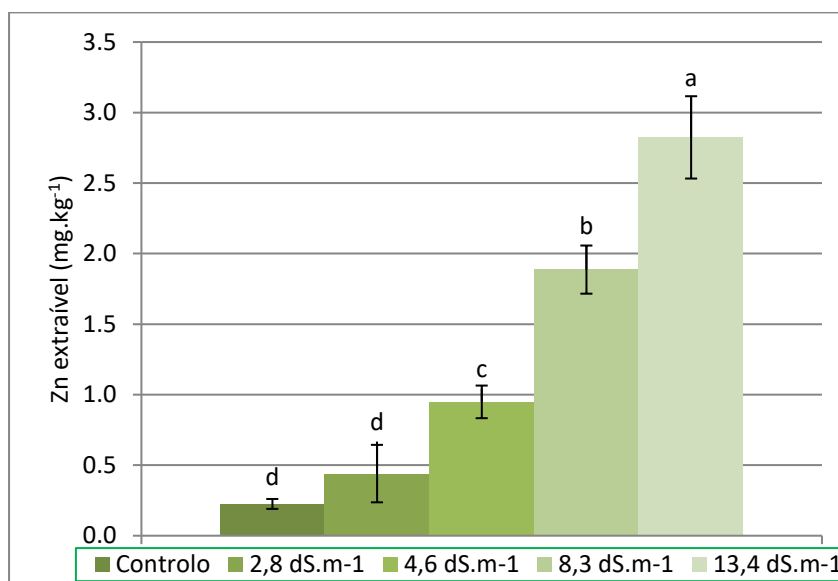


Figura 36 – Concentração de zinco extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados para cada modalidade. As barras representam o desvio padrão.

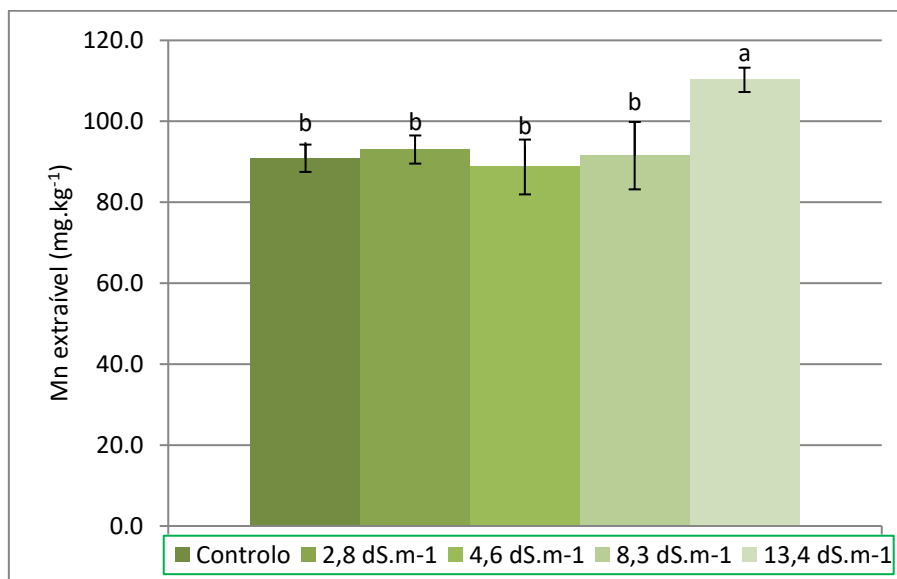


Figura 37 – Concentração de manganês extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados para cada modalidade. As barras representam o desvio padrão.

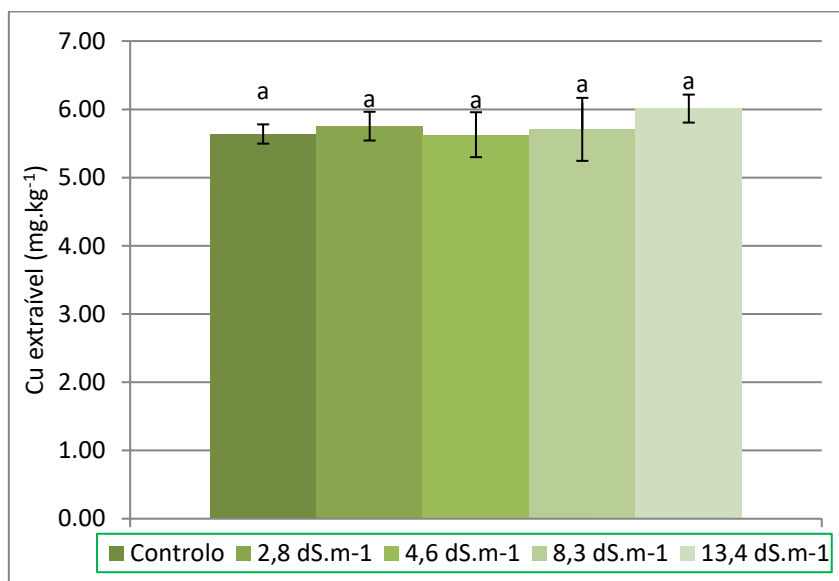


Figura 38 – Concentração de cobre extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados para cada modalidade. As barras representam o desvio padrão.

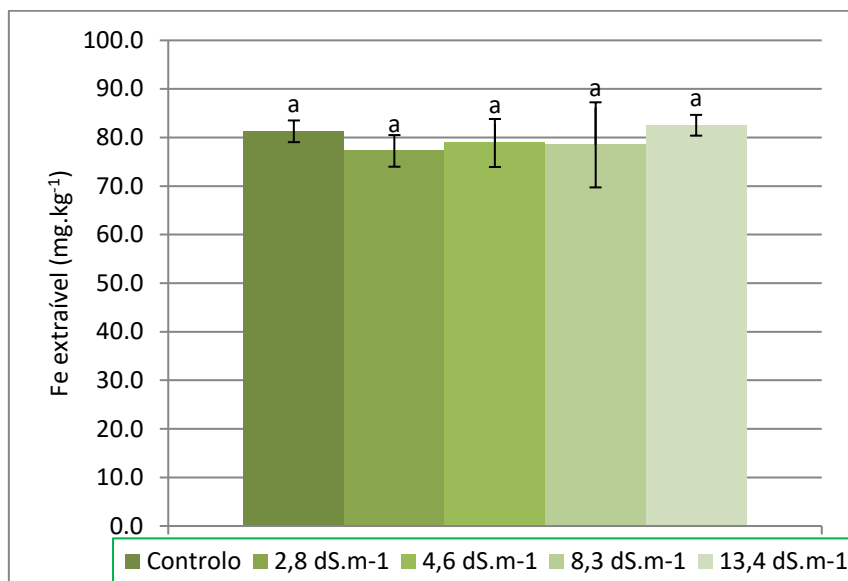


Figura 39 – Concentração de ferro extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados para cada modalidade. As barras representam o desvio padrão.

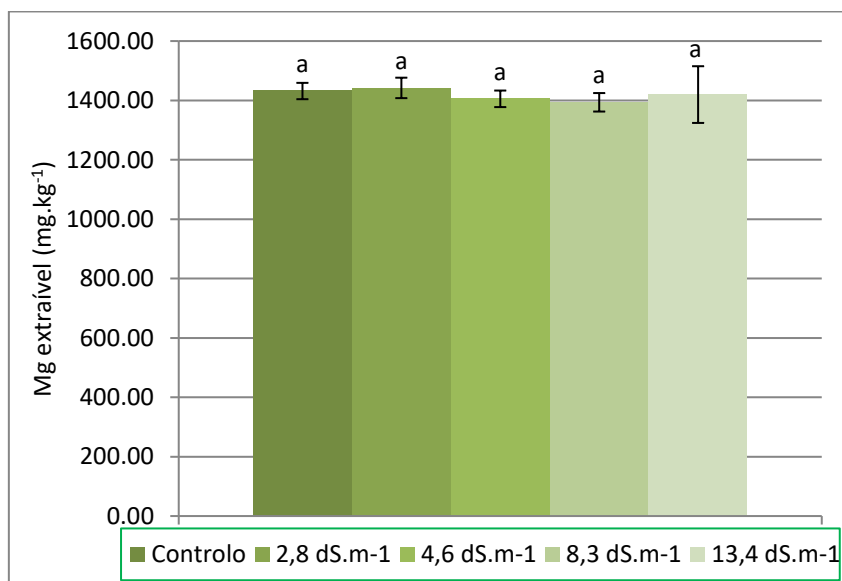


Figura 40 – Concentração de magnésio extraível nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados para cada modalidade. As barras representam o desvio padrão.

4.9.5 Carbono orgânico total

Não se verificou-se efeito da salinidade sobre a concentração de carbono orgânico total no solo ($p < 0,05$), como observado na Figura 41.

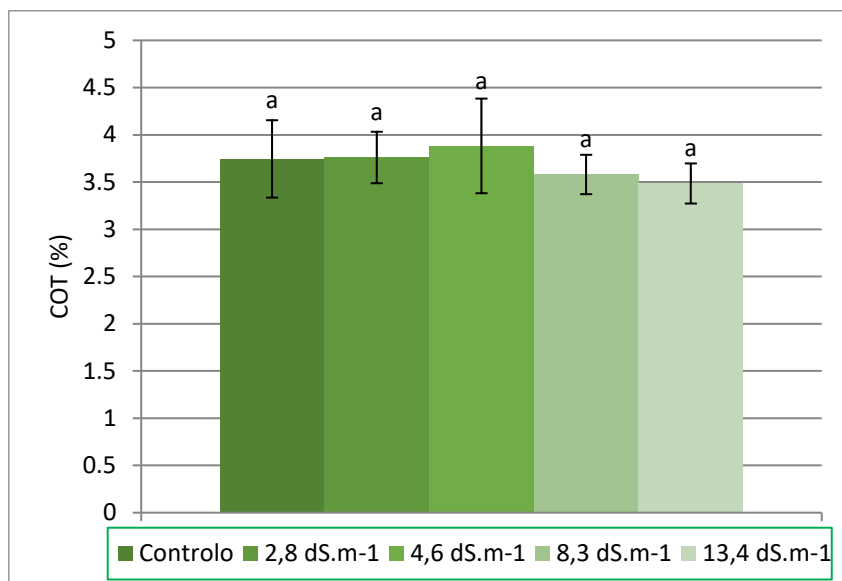


Figura 41 – Carbono orgânico total nos solos contaminados com diferentes níveis de salinidade. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os valores registados para cada modalidade. As barras representam o desvio padrão.

CONCLUSÕES INTERCALARES:

A salinidade do solo resultou num aumento significativo das concentrações de N, P e K extraíveis, o que se explica pelo menor crescimento das plantas nos solos mais contaminados, e consequente menor extração de nutrientes por parte das plantas.

A salinidade do solo resultou num aumento significativo das concentrações de Na, Zn e Mn (resultados da extração afetados pela alta CE dos solos), mas não se observou efeito significativo deste fator para o Cu, Fe e COT.

5. Conclusões

Após análise e discussão dos resultados, foi possível caraterizar os efeitos do stresse salino por NaCl em plantas de manjerição. O Quadro A1 em anexo resume os efeitos da salinidade sobre os parâmetros em estudo.

Concluiu-se que o manjerição é uma cultura sensível ao stresse salino por NaCl, seja durante a germinação, seja durante o crescimento. A salinidade do solo teve um efeito significativo sobre a capacidade germinativa das sementes, observando-se também um efeito negativo não significativo deste fator sobre o tempo médio de germinação. Nas modalidades de tratamento com CE acima de $4,6 \text{ dS.m}^{-1}$, nenhuma semente do ensaio germinou. A salinidade teve efeito negativo significativo sobre todos os parâmetros de crescimento das plantas analisados (biomassa, número de folhas, comprimento dos entrenós e altura total do caule). A concordância no efeito causado pela salinidade nestes parâmetros demonstra que há processos físicos e metabólicos a serem afetados pelas condições salinas, manifestando-se em diferentes caraterísticas do crescimento das plantas.

De modo análogo, a elevada CE dos solos mais contaminados resultou num efeito negativo significativo sobre o teor de massa seca nas folhas (mas não deste parâmetro nos caules e nas raízes) e sobre o seu teor de clorofila, indiciando a diminuição da taxa fotossintética como uma das caraterísticas mais importantes que se evidenciam em situações de stresse salino por NaCl.

Os resultados da análise do conteúdo mineral dos órgãos vegetais revelaram um efeito positivo geral da salinidade sobre os elementos analisados, mas os resultados não são congruentes com estudos anteriores na bibliografia, nem são apoiados pelos dados da extração mineral do solo. Contudo, foi evidente a maior acumulação de Fe nas raízes das plantas em relação aos caules e folhas. A relação K/Na diminuiu com o aumento da salinidade, mas esta diminuição não resultou na diminuição de acumulação de Ca esperada, segundo os dados obtidos.

A salinidade do solo não resultou em efeitos significativos sobre o teor de H_2O_2 nem sobre o teor de MDA nas folhas, o que sugere que o stresse oxidativo não é um componente fundamental do stresse salino no manjerição, não havendo fortes sinais de aumento de produção de H_2O_2 ou peroxidação lipídica. Por outro lado, os resultados para os teores de prolina livre e proteína solúvel (efeito positivo significativo do fator) e açúcares solúveis (efeito positivo não significativo do fator) sugerem que a planta sintetiza osmólitos que auxiliam na manutenção do equilíbrio osmótico das células em condições salinas.

Considerando os dois conjuntos de resultados, em 4.7 e 4.8, conclui-se que o crescimento da planta sobre condições de stresse salino por NaCl é afetado em maior grau pelo efeito osmótico da salinidade do que pelo efeito do stresse oxidativo.

Como proposta de trabalhos futuros, sugere-se a avaliação da atividade de enzimas ligadas à captura e eliminação de ROS como a superóxido-dismutase, a catalase, a glutatióna-redutase e as enzimas da família das peroxidases, de forma a contribuir para o conhecimento do tema deste trabalho, identificando as enzimas específicas associadas à tolerância ao stresse oxidativo.

6. Referências Bibliográficas

- Adolf, V. I.; Jacobsen, S.; Shabala, S. 2013. Salt tolerance mechanisms in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Environmental and Experimental Botany* 92: 43-54.
- Allen, R.G.; Pereira, L.S.; Raes, D.; Smith, M. 1998. *Crop Evapotranspiration - Guidelines for Computing Crop Water Requirements*. FAO Irrigation and Drainage Paper 56. 1ª edição. Food and Agriculture Organization, Roma.
- Alizadeh, M. R.; Dabbaghi, A.; Rahimi-Aidadi, F.; Rezaei, M.; Rahmati, M. H. 2011. Effect of salinity and irrigation regimes on the internode physical variations of rice stem. *AJCS* 5(12): 1595-1602.
- Almeida, D. 2006. Manual de Culturas Hortícolas – Volume I. 1ª edição. Editorial Presença, Lisboa.
- Anower, M. R.; Peel, M. D.; Mott, I. W.; Wu, Y. 2017. Physiological processes associated with salinity tolerance in an alfalfa half-sib family. *J. Agro. Crop Sci.* 203(5): 345-358.
- Apel, K.; Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.
- Amor N. B.; Ben Hamed, K.; Debez, A.; Grignon, C.; Abdelly, C. 2005. Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity. *Plant Science* 168: 889-899.
- Aspinall, D.; Paleg, L. G. 1981. *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. 1ª edição. Sidney: Academic Press Australia. Capítulo 10, *Proline Accumulation: Physiological Aspects*, 205-241.
- Ayers, R. S.; Westcot, D. W. 1985. *Water Quality for Agriculture*. FAO Irrigation and Drainage Paper 29. 3ª edição. Food and Agriculture Organization, Roma.
- Balbino, L. R. 1968. O método de Egnér-Riehm na determinação do fósforo e do potássio assimiláveis em solos de Portugal. *Revista Agronómica*, 51: 46-56.
- Bates, L. S.; Waldren, R. P.; Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.
- Bione, M.; Paz, V.; da Silva, F.; Ribas, R. F.; Soares, T. F. 2014. Crescimento e produção de manjerição em sistema hidropônico NFT sob salinidade. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 18(12): 1228-1234.
- Blanco, F. F.; Folegatti, M. V. 2008. Doses de N e K no tomateiro sob estresse salino: III. Produção e qualidade de frutos. *Resvista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 12(2): 122-127.
- Bradford, M. 1976. Rapid and sensitive method for qualification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 1-2.
- Bor, M.; Özdemir, F.; Türkan, I. 2003. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Science* 164: 77-84.
- Botella, M. A.; Martínez, V.; Nieves, M.; Cerdá, A. 1997. Effect of salinity on the growth and nitrogen uptake by wheat seedlings, *J. Plant Nutr.*, 20: 793-804.
- Cakmak, I. 2006. Role of mineral nutrients in tolerance of crop plants to environmental stress factors. *Plant Cell Physiol.* 38: 35-48.
- Cardoso, J. C.; Bessa, M. T.; Marado, M. B. (1971). Carta dos solos de Portugal, 1: 1000000. Secretaria de Estado da Agricultura-Serviço de Reconhecimento e de Ordenamento Agrário.
- Carter, D. L. 1975. *Plants in Saline Environment*. 1ª edição. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin. Capítulo 2, *Problems of Salinity in Agriculture*, 25-35.

- Carvalho, J. B.; Andrade, D. S.; Silva, V. M.; Souza, F. S. 2016. Efeito do estresse salino na germinação de sementes de *Ocimum basilicum* L. *International Refereed Journal of Scientific Research in Engineering* 1: 3-6.
- Chapman, V. J. 1975. *Plants in Saline Environment*. 1ª edição. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin. Capítulo 1, *The Salinity Problem in General, Its Importance and Distribution with Special Reference to Natural Halophytes*, 7-24.
- Chawla, S.; Jain, S.; Jain, V. 2012. Salinity induced oxidative stress and antioxidant system in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 22: 27-34.
- Chow, P. K.; Landäusser, S. M. 2004. A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. *Tree Physiology* 24: 1129-1136.
- Chow, W. S.; Ball, M. C.; Anderson, M. J. 1990. Growth and photosynthetic responses of spinach to salinity: implications of K⁺ nutrition for salt tolerance. *Australian Journal of Plant Physiology*, 17: 563-578.
- Cerezo, M.; García-Agustin, P., Serna, D., Primo-Milo, E. 1997. Kinetics of nitrate uptake by *Citrus* seedlings and inhibitory effects of salinity. *Plant Science*, 126: 105-112.
- Cuartero, J.; Muñoz, R. F. 1999. Tomato and salinity. *Scientia Horticulturae*, 78: 127-157.
- Dabire, C. M.; Nebie, R.; Pale, E.; Nacro, M. 2012. Cottonseeds oil conservation test by using *Ocimum basilicum* essential oil as natural antioxidant. *Der Chemica Sinica* 3(5): 1305-1310.
- Deane-Drummond, C. E.; Glass, A. D. 1982. Studies on nitrate influx into barley roots by the use of ³⁶ClO₃⁻ as a tracer for nitrate. Interactions with chloride and other ions. *Can. J. Bot.*, 60: 2147-2153.
- Delavari, M.; Enteshari, S.; Kalantari, K. M. 2014. Effects of response of *Ocimum basilicum* to the interactive effect of salicylic acid and salinity stress. *Iranian Journal of Plant Physiology* 4(2): 983-990.
- Demiral, T.; Turkan, I. 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 53(3): 247-257.
- Dias, N.; Blanco, F. 2010. *Manejo da Salinidade na Agricultura: Estudos Básicos e Aplicados*. 1ª edição. Fortaleza: INCTSal. Capítulo 9, *Efeitos dos sais no solo e na planta*, 129-142.
- Duru, M.; Al Haj Khaled, R.; Ducourtieux, C.; Theau, J. P.; de Quadros, F. L.; Cruz, P. 2009. Do plant functional types based on leaf dry matter content allow characterizing native grass species and grasslands for herbage growth pattern? *Plant Ecology* 201(2): 421-433.
- Eaton, F. M. 1966. *Diagnostic Criteria for Plants and Soils*. 2ª edição. Boca Raton: University of California – Division of Agricultural Sciences, Capítulo 5, *Chlorine*, 98-135.
- Fatemi, R.; Aboutalebi, A. 2012. Evaluation of the interaction of salinity and salicylic acid on sweet basil (*Ocimum basilicum*) properties. *Annals of Biological Research* 3(11): 5106-5109.
- Gardé, A.; Gardé, N. 1988. *Culturas Hortícolas*. 6ª edição. Clássica Editora, Lisboa.
- Garibaldi, A.; Gullino, M. L.; Minuto, G. 1997. Disease of basil and their management. *Plant Disease* 81(2): 124-132.
- Grattan, S. R.; Grieve, C. M. Salinity-mineral relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 78: 127-157.
- Greenway, H.; Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 31: 149-190.
- Gupta, A. K.; Kaur, N. 2005. Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J. Biosci.* 30: 761-776.

- Harley, M. M.; Paton, A.; Harley, R. M.; Cade, P. G.. 1992. Pollen morphological studies in the tribe *Ocimeae* (*Nepetoideae* *Labiatae*): *Ocimum* L.. *Grana* 31: 161-176.
- Hayat, S.; Hayat, Q.; Alyemeni, M. N.; Wani, A. S.; Pichtel, J.; Ahmad, A.. 2012. Role of proline under changing environments: A review. *Plant Signaling & Behaviour* 7(11): 1456-1466.
- Heidari, M. 2011. Effects of salinity stress on growth, chlorophyll content and osmotic components of two basil (*Ocimum basilicum* L.) genotypes. *African Journal of Biotechnology* 11(2): 379-384.
- Houba, V.J.; van der Lee, J.J.; Novozamsky, I. 1995. Soil Analysis Procedures – Other Procedures. Parte 5B. Ed.Wageningen Agricultural University. Holanda.
- Huang, Y.; Wei, K.; Yang, J.; Dai, F.; Zhang, G. 2007. Interaction of salinity and cadmium stresses on mineral nutrients, sodium, and cadmium accumulation in four barley genotypes. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 8(7): 476-485.
- Jamil, M.; Lee, C. C.; Rehman, S. U.; Lee, D. B.; Rha, E. S. 2005. Salinity (NaCl) tolerance of *Brassica* species at germination and early seedling growth. *Electronic J. Environ. Agric. Food Chem.* 4(4): 970-976.
- Katerji, N.; van Hoorn, J. W.; Hamdy, A.; Mastorilli, M. 2000. Salt tolerance classification of crops according to soil salinity and to water stress day index. *Agricultural Water Management* 43: 99-109.
- Keshavarz, P.; Malakouti, M.J.; Karimian, N.; Fotovat, A. 2006. The effects of salinity on extractability and chemical fractions of zinc in selected calcareous soils of Iran. *J. Agric. Sci. Technol.* 8: 181-190.
- Khan, M. S.; Yu, X.; Kikuchi, A.; Asahina, M.; Watanabe, K. N. 2009. Genetic engineering of glycine betaine biosynthesis to enhance abiotic stress tolerance in plants. *Plant Biotechnology* 26: 125-134.
- Khattak, R. A.; Jarrell, W, M. 1989. Effect of saline irrigation waters on soil manganese leaching and bioavailability to sugar beet. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53: 142-146.
- Kong-ngern, K.; Bunnag, S.; Theerakulpisut, P. 2012: Proline, hydrogen peroxide, membrane stability, and antioxidant enzyme activity as potential indicators for salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Botany* 8(2): 54-65.
- Kosová, K; Prášil; I. T.; Vítávmás, P. 2013. Protein contribution to plant salinity response and tolerance acquisition. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 6757-6789.
- Lakanen, E.; Ervio, R. 1971. A comparison of eight extractants for the determination of plant available micronutrients in soils. *Acta. Agr. Fenn.* 123: 232-233.
- Läuchli, A.; Epstein, E. 1990. *Agricultural Salinity Assessment and Management*. 1ª edição, Reston: American Society of Civil Engineers. Capítulo 6, *Plant responses to saline and sodic conditions*, 113-137.
- Läuchli, A.; Grattan, S. R. 2012. *Agricultural Salinity Assessment and Management*. 2ª edição, Reston: American Society of Civil Engineers. Capítulo 6, *Plant responses to saline and sodic conditions*, 169-205.
- Leitão, I (2014): Exposição e acumulação de elementos potencialmente tóxicos em plantas de colza (*Brassica napus* L.). Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.
- Lima, L.; Grismer, M. E.; Nielsen, D. R. 1990. Application of fracture mechanics to cracking of saline soils. *Soil Science* 158(2): 451-458.
- Makri, O.; Spiridon, K. 2008. *Ocimum* sp. (Basil): Botany, cultivation, pharmaceutical properties, and biotechnology. *Journal of Herbs, Spices & Medical Plants* 13(3): 123-150.
- Matysik, J.; Alia; Bhalu, B.; Mohanty, P. 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Curr. Sci.* 82: 525-532.

- May, M.; Vernoux, T.; Leaver, C.; van Montagu, M.; Inzé, D. 1998. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J. Exp. Bot.* 49: 649-667.
- Mansour; M. M. 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol. Plant.* 43(4):491-500.
- McDonald, A. J.; Ericsson, T.; Larsson, C. 1996. Plant nutrition, dry matter gain and partitioning at the whole plant level. *Journal of Experimental Botany* 47: 1245-1253.
- Mengel, K.; Kirby, E. A. 1981. *Principles of Plant Nutrition*. 3ª Edição. International Potash Institute, Berna.
- Miceli, A.; Moncada, A.; D'Anna, F. 2003. Effect of water salinity on seeds-germination of *Ocimum basilicum* L., *Eruca sativa* L. and *Petroselinum hortense* Hoffm. *Acta Hortic.* 609: 365-370.
- Mohammadizad, H. A.; Mirzakhani, G.; Ghafari, M.; Smavatipour, P.; Araghi, S. M.; Fatehi, M. F. 2014. Effect of NaCl stress on seed germination indices and early seedling growth of cumin (*Cuminum cyminum* L. – an important medicinal plant). *Agriculture Science Developments* 3(2): 161-166.
- Montez, A. C. 2014. Exposição e acumulação de elementos potencialmente tóxicos em manjerição (*Ocimum basilicum*). Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Moraes, G. A.; Menezes, N. L.; Pasqualli, L. L. 2005. Comportamento de sementes de feijão sob diferentes potenciais osmóticos. *Cienc. Rural* 35(4): 776-780.
- Mousavi, S. G.; Jouyaban, Z. 2011. Effect of salinity stress on germination and growth parameters of seedlings of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Tech. J. Engin. & App. Sci.* 2(4): 84-87.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 239-250.
- Munns, R.; Termaat, A. 1986. Whole-plant responses to salinity. *Australian Journal of Plant Physiology* 13: 143-160.
- Munns, R.; Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 59: 651-681.
- Møller, I. M.; Jensen, P. E.; Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. Review. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 459-481.
- Nemati, I.; Moradi, F.; Gholizadeh, S.; Esmaeili, M. A.; Bihamta; M. R. 2011. The effect of salinity stress on ions and soluble sugars distribution in leaves. Leaf, sheaths and roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Soil Environ.* 57(1): 26-33.
- Neto; A. A.; Prisco, J. T.; Gomes-Filho, E. 2009. Changes in soluble amino-N, soluble proteins and free amino acids in leaves and roots of salt-stressed maize genotypes. *Journal of Plant Interactions* 4(2): 137-144.
- Orcutt, D. M.; Nielsen, E. T. 2000. *Physiology of Plants Under Stress: Soil and Biotic Factors* – Volume II. 1ª edição. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
- Pandey, V.; Ansari, M. W.; Tula, S.; Sahoo, R. K.; Bains, G.; Kumar, J.; Tuteja, N.; Shukla, A. 2016. *Ocimum sacntum* leaf extract induces drought stress tolerance in rice. *Plant Signaling & Behaviour* 11(5): 400-409.
- Paton, A; Harley, M. R.; Harley, R. M. 1999. *Basil: The Genus Ocimum* 1ª edição. Amsterdão: Overseas Publishers Association. Capítulo 1, *Ocimum: An Overview of Classification and Relationships*, 1-38.
- Pessaraki, M.; Szabolcs, I. 2011. *Handbook of Plant and Crop Stress*. 5ª edição. Boca Raton: CRC Press. Capítulo 1, *Soil Salinity and Sodicyty Problems*, 3-22.

- Phills, B. R.; Peck, N. H.; MacDonald, G. E.; Robinson, R. W. 1979. Differential responses of *Lycopersicon* and *Solanum* species to salinity. *Journal of the American Socceity for Horticultural Science*, 104(3): 349-352.
- Polle, A. 2001. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate peroxidase-gluthanione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol.* 126: 445-462.
- Pryor, W. A.; Stanley, J. P. 1975. Letter: A suggested mechanism for the production of malondialdehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J. Org. Chem.* 40(24): 3615-3617.
- Putievsky, E. 1983. Temperature and daylength influences on the growth of sweet basil and oregano. *Journal of Horticultural Science* 58(4): 583-587.
- Rao, E. V.; Puttana, K.; Rao, R. S.; Ramesh, S. 2007. Nitrogen and potassium nutrition of French basil (*Ocimum basilicum* Linn.). *J. Spices Arom. Crops* 16(2), 99-105.
- Raoul, L.; Andres, O.; Armado, L.; Bernardo, M.; Enrique, T. 2003. Response to salinity of three grain legumes for potential cultivation in arid areas (plant nutrition). *Soil Sci. Plant Nutr.* 49(3): 329-336.
- Ramezani, S.; Rezaei, M. R.; Sotoudehnia, P. 2009. Improved growth, yield and essential oil content of basil grown under different levels of phosphorous sprays in the field. *J. Appl. Biol. Sci.* 3(2): 96-101.
- Ramin, A. A. 2006. Effects of salinity and temperature on germination and seedling establishment of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 11(4): 81-90.
- Ramírez-Sandoval, M.; Melchor-Partida, G. N.; Muñiz-Hernández, S.; Girón-Pérez, M. I.; Rojas-García, A. E.; Medina-Díaz, I. M.; Robledo-Marenco, M. I.; Robledo-Marenco, M. I.; Velázquez- Fernández. 2011. Phytoremediatory effect and growth of two species of *Ocimum* in endosulfan poluted soil. *Journal of Hazardous Materials* 192: 388-392.
- Ranal, M. A.; de Santana, D. G.; Ferreira, W. R.; Mendes-Rodrigues, C. 2008. Calculating germination measurements and organizing spreadsheets. *Revista Brasil. Bot.* 32(4): 849-855.
- Rhodes, D.; Samaras, Y. 1994. *Cellular and molecular physiology of cell volume regulation*. 1ª edição. CRC Press. Capítulo 21, *Genetic control of osmoregulation in plants*, 347-361.
- Robinson, S. P.; Jones, G. P. 1986. Accumulation of glycine betaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress. *Aust. J. Plant. Physiol.* 13: 659-666.
- Rosa, M.; Prado, C.; Podazza, G.; Interdonato, R.; González, J. A.; Hilal, M.; Prado, F. E. 2009. Soluble sugars. *Plant Signlaing & Behaviour* 4(5): 388-393.
- Rubio, F.; Flores, P.; Navarro, J. M.; Martínéz, V. 2003. Effects of Ca²⁺, K⁺ and cGMP on Na⁺ uptake in pepper plants. *Plant Science*, 165: 1043-1049.
- Qados, A. A. 2011. Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 10: 7-15.
- Sacks, M. M.; Silk, W. K. 1997. Effect of water stress on cortical cell division rates within the apical meristem of primary root of maize. *Plant Physiol.* 114: 707-712.
- Sakamoto, A.; Murata, N. 2000. Genetic engineering of glycine betaine synthesis in plants: current status and implication for enhacement of stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 51: 81-88.
- Schoellenberger, C. J.; Simon, R. H. 1945. Determination of exchange capacity and exchangeable bases in soil-amonium acetate method. *Soil Science* 59: 13-24.
- Sekmen, A. H.; Türkan, I.; Takio, S. 2007. Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt tolerant *Plantago maritima* and salt-sensitive *Plantago media*. *Physiol. Plant.* 131(3): 399-411.

- Sgherri, C.; Navari-Izzo, F.; Pardossi, A.; Soressi, G. P.; Izzo, R. 2007. The influence of diluted seawater and ripening stage on the content of antioxidants in fruits of different tomato genotypes. *J Agric Food Chem* 55: 2452–2458.
- Sgherri, C.; Kadlecova, Z.; Pardossi, A.; Navari-Izzo, F.; Izzo, R. 2008. Irrigation with diluted seawater improves the nutritional value of cherry tomatoes. *J Agric Food Chem* 56: 3391–3397
- Shannon, M. C.; Grier, C. M. 1999. Tolerances of vegetable crops to salinity. *Science Horticulturae* 78: 5-38.
- Shahid, S.; Rahman, K. 2011. *Handbook of Plant and Crop Stress*. 5ª edição. Boca Raton: CRC Press. Capítulo 2, *Soil Salinity Development, Classification, Assessment, and Management in Irrigated Agriculture*, 23-40.
- Sharafzadeh, S.; Alizadeh, O. 2011. Nutrient supply and fertilization of basil. *Advances in Environmental Biology* 5(5): 956-960.
- Sharma, P.; Jha, A. B.; Dubey, R. S.; Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 12: 1-26.
- Silveira, J.; Silva, S.; Silva, E. N.; Viégas, R. A. 2010. *Manejo da Salinidade na Agricultura: Estudos Básicos e Aplicados*. 1ª edição. Fortaleza: INCTSal. Capítulo 9, *Mecanismos Biomoleculares Envolvidos com a Resistência ao Estresse Salino em Plantas*, 161-180.
- Simon, J. E.; Morales, M. R.; Phippen, W. B.; Vieira, R. F.; Hao, Z. 1999. *Perspectives on New Crops and New Uses – Volume 4*. 1ª edição. Alexandria: ASHS Press. Capítulo 16, *Basil: a Source of Aroma Compounds and a Popular Culinary and Ornamental Herb*, 499-505.
- Singh, N.; Ma, L. Q.; Srivastava, M.; Rathinasabapathi, B. 2006. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science* 170: 274-282.
- Srivastava, A. K. 1980. French basil and its cultivation in India. *Farm Bulletin* 16: 15.
- Taie, H. A.; Slazama, S. A.; Radwan, S. 2010. Potential activity of basil as a source of antioxidants and anticancer agents as affected by organic and bio-organic fertilization. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* 38(1): 119-127.
- Tarchoun, I.; Sgherri, C.; Izzo, R.; Lachaal, M.; Ouerghi, Z.; Navari-Izzo, F. 2010. Antioxidative responses of *Ocimum basilicum* to sodium chloride or sodium sulphate salinization. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 772-777.
- Tarchoun, I.; Sgherri, C.; Izzo, R.; Lachaal, I. M.; Ouerghi, Z.; Navari-Izzo, F. 2012. Changes in the antioxidative systems of *Ocimum basilicum* L.(cv. Fine) under different sodium salts. *Acta Physiol. Plant* . 34: 1873–1881.
- Tavallalli, V.; Rahemi, M.; Maftoun, M.; Vaezpour, M. 2009. Zinc influence and salt stress on photosynthesis, water relations, and carbonic anhydrase activity in pistachio. *Scientia Horticulturae* 123: 272-279.
- Tester, M.; Davenport, R. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91(5): 503-527.
- Tilebeni, H. G.; Navaye, H. N.; Eslami, H.; Seraji, R. N. 2011. Effects of salinity stress on seed reserves depletion in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant cultivars. *J. Nov. Appl. Sci.* 2(4): 1234-1238.
- Ullrich, W. R. 2002. *Salinity: Environment – Plants – Molecules*. 1ª edição. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Capítulo 11, *Salinity and Nitrogen Nutrition*, 229-248.
- Umerie, S. C.; Anaso, H. U.; Anyasoro, L. J. 1998. Insecticidal potentials of *Ocimum basilicum* leaf extract. *Bioresource Technology* 64: 237-239.
- Varenes, A. 2003. *Produtividade dos Solos e Ambiente*. 1ª edição. Escolar Editora, Lisboa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Caraterização do stresse salino em plantas de manjerição (*Ocimum basilicum* L.)

- Volkmar, K. M.; Hu, Y.; Stephunn, H. 1998. Physiological responses of plants to salinity: A review. *Can J. Plant Sci.* 78: 19-27.
- Wang, L.; Shoealter, A. M.; Ungar, I. A. 1997. Effect of salinity on growth, ion content, and cell wall chemistry in *Atriplex prostate* (*Chenopodiaceae*). *American Journal of Botany* 84(9): 1247-1255.
- Xiong, L.; Zhu, J. K. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ.* 25: 131-139.
- Yancey, P. H. 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology* 208: 2819-2830.
- Yancey, P. H.; Clark, M. E.; Hand, S. C.; Bowlus, R. D.; Somero, G. N. 1982. Living with stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217: 1214-1222.
- Zeng, L.; Poss, J.; Wilson, C.; Draz, A. S.; Grieve, C. M. 2003. Evaluation of salt tolerance in rice genotypes by physiological characters. *Euphytica*, 129: 281-292.
- Zhu, J. K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66-71.

Anexos

Quadro A1 – Resumo dos efeitos da salinidade por NaCl em plantas de manjerição, para os parâmetros em estudo. As setas representam um efeito negativo ou positivo do fator sobre o parâmetro; - representa um conjunto de resultados sem tendência observada; * representa significância estatística ($p < 0,05$).

	Folhas		Caules		Raízes
Parâmetros em Estudo	Clnt	CFin	Clnt	CFin	CFin
Capacidade Germinativa			↓*		
Tempo Médio de Germinação			↑		
Biomassa das Plantas			↓*		
Biomassa	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*
Número de Folhas por Planta	↓*	↓*			
Comprimento dos entrenós			↓*	↓*	
Altura dos Caules			↓*	↓*	
Teor de Massa Seca	↓*	↓*	↑	↓	-
Teor de Clorofila	↓*	↓*			
[Na]	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*
[Cu]	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*
[K]	↓*	↑*	↑*	↓*	↑*
[Ca]	↑*	↑*	↑*	-	↑*
[Mn]	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*
[Fe]	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*
[Mg]	↑*	↑*	↑*	-	↑*
[Zn]	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*
K/Na	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*
[H2O2]		-			
[MDA]		-			
[Prolina]		↑*			
[Proteína Solúvel]		↑*			
[Açúcares Solúveis]		↑*			
NH ₄ ⁺ Extraível			↑*		
NO ₃ ⁻ Extraível			-*		
P Extraível			↑*		
K Extraível			↑*		
Na Extraível			↑*		
Ca Extraível			-		
Zn Extraível			↑*		
Mn Extraível			↑*		
Cu Extraível			-		
Fe Extraível			-		
Mg Extraível			-		
COT			-		